

Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное агентство по образованию

Санкт-Петербургский Государственный Университет

Физический факультет

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Маркизов Леонид Петрович

**Сравнение влияния ряда коротких пептидов на конформацию молекулы ДНК в
растворе**

Научный руководитель

д. ф-м. н., профессор

Касьяненко Н.А.

Рецензент

д. биол. н., доцент

Линькова Н.С.

Санкт-Петербург

2017

Аннотация

Ключевые слова: короткие пептиды, ДНК, гиперхромный эффект, гипохромный эффект, спектры, раствор, комплекс.

Некоторые короткие пептиды известны как природные биорегуляторы различных физиологических процессов в человеческом теле. Изучение механизма взаимодействия коротких пептидов с ДНК, которая является возможной молекулярной мишенью для таких пептидов, позволит определить механизм действия на организм в целом.

Целью работы является исследование взаимодействия коротких пептидов AEDG, EDR, AEDL и KEDW с нативной макромолекулой ДНК и изучение их влияния на конформацию ДНК *in vitro*. Сравнительный анализ полученных спектральных данных показывает, что все пептиды взаимодействуют с макромолекулой ДНК в растворе. Установлено, что пептиды оказывают влияние на вторичную структуру ДНК.

Summary

Key words: short peptides, DNA, hyperchromic effect, hypochromic effect, spectra, solution, complex.

Some short peptides are known as natural bioregulators for different physiological processes of human body. Study of the molecular mechanism of the interaction of short peptides with DNA, which is a possible molecular target for these peptides, can determine action mechanism on an organism in total.

The aim is to study the interaction of peptides AEDG, EDR, AEDL and KEDW with native macromolecule DNA *in vitro*. Comparative analysis of the data shows that peptides interact with DNA in solution. It has been established that peptides influence on a secondary structure of DNA.

Содержание

Введение.....	4
Часть 1. Биологическая роль коротких пептидов.....	5
1.1. Короткие пептиды и их биологическая активность.....	5
1.2. Описание пептида AEDG.....	6
1.3. Описание пептида EDR.....	7
1.4. Описание пептида AEDL.....	8
1.5. Описание пептида KEDW.....	9
1.6. Механизм проникновения коротких пептидов в клетку, их взаимодействие с молекулой ДНК.....	10
Часть 2. Некоторые сведения о методической части работы.....	11
2.1. Материалы.....	11
2.2. Метод Спирина.....	13
2.3. УФ – спектрофотометрия.....	13
2.4. Плавление ДНК.....	15
Часть 3. Результаты и обсуждение.....	16
3.1. Исследование взаимодействия молекулы ДНК с AEDG (эпиталон).....	16
3.2. Исследование взаимодействия молекулы ДНК с EDR (пинеалон).....	18
3.3. Исследование взаимодействия молекулы ДНК с AEDL (бронхоген).....	26
3.4. Исследование взаимодействия молекулы ДНК с KEDW (панкраген).....	33
Часть 4. Вывод.....	37
Заключение.....	38
Список литературы.....	38

Введение

Старение человека - это биологический процесс, при котором организм теряет часть своих функций таких, как размножение и регенерация клеток. При этом частично или полностью теряется способность противостоять различным болезням, стрессу, а также становится труднее приспособиться к агрессивной окружающей среде. В целом ряде исследований, проведенных на клеточных культурах, лабораторных животных и добровольцах было показано, что ряд коротких пептидов оказывает биорегуляторное и геропротекторное действие. В связи с этим возникла необходимость проверки возможного воздействия таких пептидов на молекулярном уровне на структуру и свойства ДНК. Подтверждение такого взаимодействия на молекулярном уровне и изучение его механизма позволяет определить механизм действия пептидов на организм в целом.

Биологическая роль коротких пептидов разнообразна. Как уже отмечалось, влияние некоторых из них на организм оказывает заметное геропротекторное действие. Кроме того известно, что нейропептиды, например, регулируют большинство процессов организма человека, в том числе, принимают участие в процессах регенерации клеток. Пептиды иммунологического действия защищают организм от попавших в него токсинов.

Для правильной работы клеток и тканей необходимо адекватное количество пептидов. Однако с возрастом и при патологии возникает их дефицит, который существенно ускоряет износ тканей, что приводит к старению всего организма: происходит торможение ряда метаболических процессов, идет снижение экспрессии генов. Сегодня проблему недостаточности пептидов в организме научились решать. Пептидный набор клетки восполняют синтезированными в лабораторных условиях короткими пептидами. Они принимают участие в активации пролиферации и дифференцировки клеток.

Целью данной работы является анализ возможности взаимодействия ряда коротких пептидов с молекулой ДНК в растворе и исследование их влияния на конформацию молекулы ДНК *in vitro*.

Для работы были выбраны следующие короткие пептиды: AEDG (эпиталон, Ala-Glu-Asp-Gly), EDR (пинеалон, Glu-Asp-Arg), AEDL (бронхоген, Ala-Glu-Asp-Leu) и KEDW (панкраген, Lys-Glu-Asp-Trp). В качестве метода исследования использовалась УФ-спектрофотометрия. Все пептиды показывали выраженную биологическую активность в опытах на животных, а также прошли клинические испытания.

Часть 1. Биологическая роль коротких пептидов

1.1. Короткие пептиды и их биологическая активность

Короткие проникающие в клетку пептиды (cell penetrating peptides, CPPs), как было сказано выше, участвуют в активации пролиферации и дифференцировки клеток, осуществляемой факторами транскрипции. Короткие пептиды состоят не более чем из 20 аминокислотных остатков с молекулярной массой до 4 кДа и являются многозарядными ионами. Они нековалентно связываются с нуклеиновыми кислотами, аминокислотами и полипептидами, и проникают в клетки, используя механизм, близкий к пиноцитозу. Предполагается, что аминокислотные остатки пептидов образуют водородные связи с функциональными группами в большой канавке двойной спирали ДНК. [1]

В результате многолетних исследований выяснено, что активность коротких пептидов является селективной. Установлено, что они тканеспецифически стимулируют синтез белка в клетках тех органов, из которых они выделены. Например, после введения обезьянам препарата эпифиза эпиталамина и синтетического пептида эпиталона было отмечено увеличение секреции металонина. [2,3]

Нарушения пептидной регуляции играют далеко не малую роль в развитии патологических процессов. Путем дополнительного введения в организм коротких пептидов можно корректировать такие нарушения, что должно приводить к регрессии патологии и нормализации функционирования организма. Для некоторых синтетических пептидов было установлено, что они, проникая в клетку, образуют комплексы с ДНК и РНК. [3]

Остатки аминокислот, из которых построены молекулы пептидов, соединены в цепь амидными (пептидными) связями $-C(O)NH-$. По количеству аминокислотных остатков (АО) пептиды делятся на короткие (до 10 АО), олигопептиды (10-50 АО) и полипептиды (>50 АО). В организме человека пептиды образуются в желудочно-кишечном тракте при гидролизе белков. Также они синтезируются в тканях для регуляции физиологических процессов и передачи биологической информации. Пептиды делятся на 4 группы по происхождению и характеру действия:

- 1) Пептиды с гормональной активностью (вазопрессин, кортикотропин и др.);
- 2) Пептиды, регулирующие пищеварительный процесс (гастрин, секретин и др.);
- 3) Пептиды-биорегуляторы, источник которых альфа-2-глобулиновая фракция сыворотки крови (ангиотензин, каллидин и др.);

- 4) Нейропептиды, синтез которых происходит в центральной и периферической нервной системе, участвующие в регуляции нервной деятельности (опиоиды, тахикилины, некоторые гипоталамические гормоны).

Важно отметить, что система коротких пептидов является генетически детерминированной совокупностью сигнальных молекул, участвующих в регуляции гомеостаза. Также установлена способность пептидов индуцировать дифференцировку полипотентных клеток. Добавление пептидов сетчатки к полипотентным клеткам ранней гаструлы лягушки *Xenopus laevis* привело к образованию клеток сетчатки и пигментного эпителия. На этой же экспериментальной модели было показано, что добавление других коротких пептидов приводит к образованию различных тканей, в зависимости от структуры добавляемого вещества. [4]

Все используемые в работе пептиды были синтезированы в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии под руководством доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента РАН, Хавинсона В.Х.

1.2. Описание пептида AEDG

Тетрапептид AEDG (Ala-Glu-Asp-Gly, эпиталон), был синтезирован на основе эпیتالамина, выделенного из пинеальной железы крупного рогатого скота. Структура эпیتالона (Рис.1.2.1) представляет собой последовательность из четырех аминокислотных остатков: аланина, глутаминовой кислоты, аспарагина и глицина. Данный пептид амфифилен, его молекулярная масса равна 390,33 Да, суммарный заряд при нейтральных pH отрицательный.

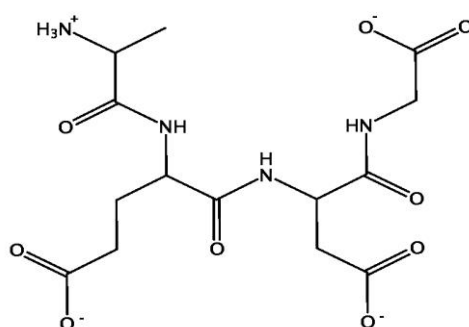


Рис.1.2.1 Структура AEDG (эпیتالон, Ala-Glu-Asp-Gly)

Влияние тетрапептида AEDG на организм включает в себя регуляцию нейроиммунноэндокринной системы, также эпیتالон снижает риск развития онкологических заболеваний [5, 6]. Противоопухолевое действие тетрапептида обусловлено специфической

регуляцией экспрессии генов. Например, после введения пептида AEDG в организм трансгенных мышей наблюдалось снижение экспрессии гена HER-2/neu (при раке молочной железы человека). [7]

Было исследовано влияние пептида AEDG на функциональное состояние хроматина в клеточных ядрах. При старении транскрипция генов и, следовательно, синтез различных белков значительно снижаются, что обусловлено изменением статуса метилирования генов и увеличением содержания неактивного гетерохроматина. Установлено, что пептид AEDG способствует переходу гетерохроматина в активный эухроматин. Таким образом, большое количество генов-мишеней становится доступными для факторов транскрипции, что приводит к увеличению синтеза белка. [8] Таким образом эпиталон действует на уровне клеточной структуры. Установлено, что пептид AEDG регулирует экспрессию более чем 200 генов, оказывает влияние на функциональную активность нейроиммуноэндокринной системы, способствует увеличению длины теломер [6, 7].

1.3. Описание пептида EDR

Структура трипептида EDR (Рис.1.3.1) (Glu-Asp-Arg, пинеалон) представляет собой последовательность из трех остатков аминокислот: глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты и аргинина. Пинеалон гидрофилен, молекулярная масса составляет 418,41 Да, при нейтральных pH суммарный заряд отрицательный.

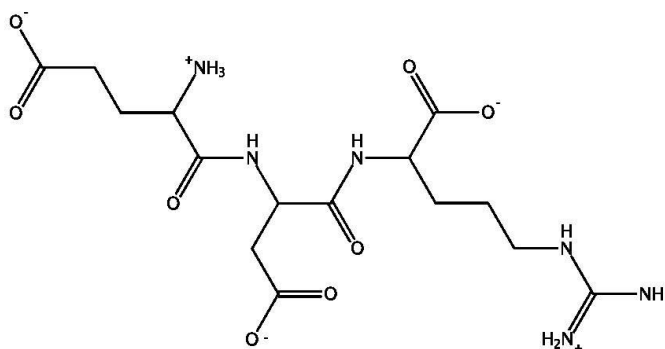


Рис.1.3.1 Структура EDR (пинеалон, Glu-Asp-Arg)

Пинеалон выполняет регуляцию функций мозга. Пинеалон способствует улучшению интеллектуальных функций головного мозга и снижает риск возникновения нейродегенеративных заболеваний таких, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. В одном исследовании проводились испытания лекарственной формы трипептида EDR. Семьдесят два пациента от 30 до 74 лет с черепно-мозговыми травмами и церебрастенией получали препарат пинеалона дополнительно к стандартной терапии. Контрольная группа состояла из тридцати

семи аналогичных пациентов, которым было назначено общепринятое лечение. По результатам исследования у пациентов испытываемой группы отметили улучшение памяти, снижение длительности и интенсивности головных болей и появление эмоциональной уравновешенности. [9]

По данным других исследований ежедневное применение пинеалона способствовало нормализации функций антиоксидантной системы, повышению уровня адаптации к физическим нагрузкам, тренированности организма и энергетического обмена. Это объясняется тем, что трипептид увеличивает уровень обеспечения энергией мышечной ткани, что коррелирует с увеличением экспрессии генов PPARA и PPARG, которые кодируют белки, увеличивающие окислительную способность скелетных мышц. [10]

1.4. Описание пептида AEDL

Тетрапептид AEDL (Рис.1.4.1) (Ala-Glu-Asp-Leu, бронхоген) состоит из последовательности четырех аминокислотных остатков аланина, глутаминовой кислоты, аспарагина и лейцина. Пептид амфифилен, его молекулярная масса составляет 446,46 Да, и суммарный заряд отрицательный при нейтральных pH.

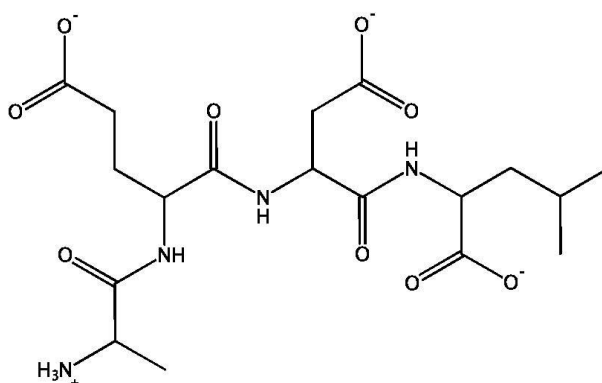


Рис.1.4.1 Структура AEDL (бронхоген, Ala-Glu-Asp-Leu)

Бронхоген имеет свойства, восстанавливающие функции легких при различных патологиях. Тетрапептид эффективен при острых воспалениях легких в результате бактериального повреждения, при хроническом фиброзном воспалительном процессе и сублетальном гипероксическом повреждении легких у животных. [11]

Пептид AEDL регулирует синтез широкого спектра белков в бронхиальном эпителии человека [12]. Он специфически влияет на процессы клеточного обновления в бронхиальном эпителии через воздействие на белки Ki67, Mcl-1, p53 и регулирует функциональное состояние клеток посредством воздействия на белки CD79 и NOS-3. Установлено, что тетрапептид

эпигенетически регулирует экспрессию генов, участвующих в дифференцировке бронхиального эпителия: Nkx2.1, SCGB1A1, SCGB3A2, FoxA1, FoxA2. Поскольку продукты некоторых из них взаимно регулируют экспрессию друг друга и, кроме того, взаимодействуют с гистонами, также являющимися мишенями действия тетрапептида, можно предположить, что пептид имеет одну ключевую или несколько независимых точек приложения в соответствующих сигнальных каскадах. Тетрапептид, активируя экспрессию генов MUC4, MUC5AC, SftpA1 - маркеров функциональной активности клеток бронхиального эпителия - может препятствовать развитию легочной патологии. [13]

1.5. Описание пептида KEDW

Структура тетрапептида KEDW (Рис.1.5.1) (Lys-Glu-Asp-Trp, панкреген) представляет собой последовательность из четырех остатков аминокислот: лизина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты и триптофана. Пептид амфифилен, его молекулярная масса равна 575,61 Да, суммарный заряд равен нулю при нейтральных pH.

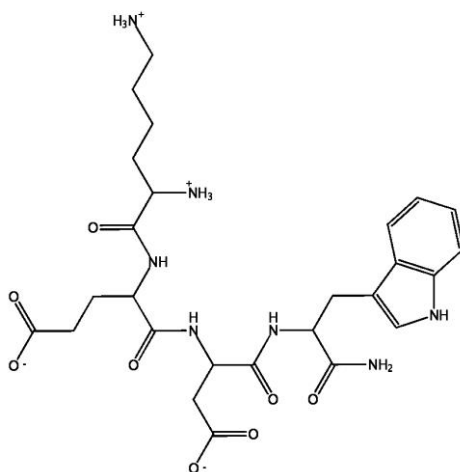


Рис.1.5.1 Структура KEDW (панкреген, Lys-Glu-Asp-Trp)

Панкреген был синтезирован в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии на основе анализа аминокислотного состава полипептидов, обладающих инсулинотропным эффектом.

Исследования на животных и клеточных культурах показали, что панкреген может регулировать функциональную активность клеток островков Лангерганса поджелудочной железы, индуцируя дифференцировку стволовых клеток в секреторные. Пептид KEDW в культурах клеток поджелудочной железы человека увеличивал экспрессию генов дифференцировки PDX1, NGN3, PAX6, FOXA2, NKX2.2, NKX6.1, PAX4 и снижал экспрессию генов MNX1 и NOXA3. [10]

Результаты эксперимента с беспородными самцами крыс с сахарным диабетом, вызванным введением аллоксана внутривенно, показали, что у животных подопытной группы, которым вводился панкреатин, наблюдалось повышение концентрации инсулина в крови, тогда как в контрольной группе инсулин в крови полностью отсутствовал [14].

1.6. Механизм проникновения коротких пептидов в клетку, их взаимодействие с молекулой ДНК

Короткие пептиды можно использовать в качестве трансмембранных носителей для лекарственных веществ, из-за их способности переносить биологически активные вещества [2]. Некоторым пептидам из-за содержания в своей структуре избытка положительно заряженных аминокислотных остатков проще пройти сквозь клеточную мембрану. Они легко преодолевают слой отрицательно заряженного гидрофильного слоя, который прилегает к мембране. Для синтетических пептидов, содержащих в структуре несколько остатков лизина, была показана не только способность проникать в клетку, но и образовывать комплексы с ДНК и РНК. Связывание таких пептидов с ДНК упрочняет ее двойную спираль. Такие пептиды способны изменять пространственную организацию ДНК, блокировать клеточный метаболизм, проникать в ядро и связывать клеточные рецепторы. [1,2]

Связывание пептида с мембраной клетки происходит путем электростатического взаимодействия между заряженными боковыми группами аминокислотных остатков пептида и различными участками мембраны. Положительно заряженные боковые группы аминокислотных остатков аргинина и лизина электростатически взаимодействуют с отрицательными карбоксильными группами фосфатидилсерина, экспонированными на внешней стороне цитоплазматической мембраны. Для отрицательно заряженных (карбоксильных) боковых групп пептидов центрами связывания являются положительно заряженные группы фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Таким образом, основным механизмом проникновения коротких пептидов является процесс, близкий к пиноцитозу. [15]

Исследование на клеточных культурах линии HeLa показало, что короткие FITC-меченные ди-, три- и тетрапептиды проникают через клеточную мембрану в клетку, клеточное ядро и ядрышко. В экспериментальных образцах под воздействием пептидов флуоресценция была обнаружена в цитоплазме, ядре и ядрышке, тогда как в контрольных флуоресценция не наблюдалась. [16]

Способность коротких пептидов проникать в клеточное ядро позволяет исследовать их взаимодействие с ДНК. Было установлено, что пептиды модулируют действие эндонуклеаз, защищая таким образом ДНК от ферментативного гидролиза. Модуляция действия

эндонуклеаз пептидами, в свою очередь, регулируется гистонами (гистон H1), тем самым в клетке (ядре) гистоны хроматина могут влиять на связывание коротких пептидов с ДНК. [2]

Метилирование ДНК влияет на ее связывание с короткими пептидами. Предполагается, что эффект одного и того же пептида будет различным в зависимости от характера метилирования участка цепи ДНК. То есть пептид будет по-разному влиять на функции генов в различных клетках (следовательно, тканях), в ядре и митохондриях, в молодых и старых, в нормальных и злокачественных клетках. [16]

Часть 2. Некоторые сведения о методической части работы

2.1. Материалы

В работе использовался коммерческий препарат ДНК тимуса теленка фирмы Sigma с молекулярной массой 9 МДа. Препарат ДНК растворяли в деионизированной воде. Водный раствор содержался при температуре 4 °С. Через неделю после его приготовления проводилось досаливание раствором хлорида натрия до молярной концентрации соли 5 мМ. В тот же день определялась концентрация ДНК в готовом растворе методом Спирина. Для исследования исходный раствор разбавляли до нужных концентраций раствором хлорида натрия с молярной концентрацией 5 мМ.

Препараты исследуемых пептидов были представлены в виде лиофилизированного сухого порошка, расфасованного в эпиндорфы по 100 мг. Пептиды растворяли до нужной концентрации в водном растворе хлорида натрия с молярной концентрацией 5 мМ. При исследовании растворов ДНК с пептидами использовали буферный раствор трис(гидроксиметил)аминометан с конечной молярной концентрацией в комплексах ДНК с пептидами в 0,01 М. Уровень рН всех растворов держался в районе семи.

Комплексы ДНК с пептидами готовились при разных соотношениях молярных концентраций пептидов и ДНК (число r): $r = \frac{C_{\text{пептида}}}{C_{\text{ДНК}}}$, где $C_{\text{пептида}}$ – молярная концентрация пептида, $C_{\text{ДНК}}$ – молярная концентрация ДНК по парам оснований.

Всего было приготовлено по девять комплексов ДНК с пептидами (с эпиталоном приготовлено пять) с разным соотношением концентраций. В таблице 1 приведены концентрации пептидов и используемые объемы для каждого комплекса. Для приготовления использовали базовые растворы ДНК и пептидов с концентрациями, указанными в таблице 2.

№ комплекса	1	2	3	4	5	6	7	8	9
r	0,1	0,3	0,5	0,7	1	3	5	7	10
$C_{пептида}$, М	$3 \cdot 10^{-6}$	$9,1 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$9,1 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$
$V_{ДНК}$, мл	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V_{EDR} , мл	0,001	0,003	0,005	0,006	0,009	0,027	0,045	0,064	0,091
V_{AEDL} , мл	0,001	0,002	0,004	0,006	0,008	0,024	0,041	0,057	0,081
V_{KEDW} , мл	0,001	0,002	0,003	0,005	0,007	0,02	0,033	0,046	0,066
V_{AEDG} , мл	0,001	-	0,003	-	0,007	-	0,035	-	0,07

Таблица 1. Используемые объемы и концентрации пептидов для каждого комплекса.

Препарат	Концентрация
ДНК	$3 \cdot 10^{-5}$ М по парам оснований (0,002%)
EDR	0,01 М
AEDL	0,0112 М
KEDW	0,0137 М
AEDG	0,013 М

Таблица 2. Концентрации базовых растворов ДНК и пептидов.

Объемы буферного раствора и раствора хлорида натрия для каждого комплекса представлены в таблице 3:

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$V(\text{NaCl}+\text{Tris})_{EDR}$, мл	1,499	1,497	1,495	1,494	1,491	1,473	1,455	1,436	1,409
$V(\text{NaCl}+\text{Tris})_{AEDL}$, мл	1,499	1,498	1,496	1,494	1,492	1,476	1,459	1,443	1,419
$V(\text{NaCl}+\text{Tris})_{KEDW}$, мл	1,499	1,498	1,497	1,495	1,493	1,48	1,467	1,454	1,434
$V(\text{NaCl}+\text{Tris})_{AEDG}$, мл	1,499	1,498	1,497	1,495	1,493	1,479	1,465	1,451	1,430

Таблица 3. Объемы трис(гидроксиметил)аминометана и раствора NaCl для каждого комплекса.

Конечные объемы растворов с комплексами составили по 3 мл. Это объем кюветы, используемой для работы со спектрофотометром СФ-56. Данный прибор применялся для проведения эксперимента по УФ-спектрофотометрии и определения концентрации раствора ДНК методом Спирина.

Используемый спектрофотометр имеет несколько основных элементов: источник излучения, испускающий свет в видимом и ультрафиолетовом диапазонах; диспергирующий элемент; ячейку для кварцевых кювет; регистрирующее устройство.

2.2. Метод Спирина

Для определения концентрации ДНК и оценки ее нативности методом Спирина необходимо знать оптическую плотность D растворов. Нативность ДНК оценивается по значению коэффициента молярной экстинкции $\varepsilon_{260}(P)$. [17]

Сначала были приготовлены промежуточные растворы путем добавления к 3 мл исходного раствора ДНК с неизвестной концентрацией 3 мл раствора хлорида натрия с молярной концентрацией 5 мМ. Полученный промежуточный раствор объемом 6 мл разливали по 1 мл в шесть пробирок. При этом в первых трех пробирках промежуточный раствор разбавляли в 3 раза пятимиллимолярным раствором соли, а в оставшихся шестипроцентным раствором хлорной кислоты. Растворы в пробирках с хлорной кислотой нагревали на водяной бане в течении 20 минут с целью получения гидролизированных растворов денатурированной ДНК. Далее снимали УФ-спектры растворов нативной ДНК (первые три пробирки) и денатурированной ДНК. Получали значения оптической плотности D_{260} при длине волны 260 нм (максимум поглощения ДНК) для нативных растворов ДНК и рассчитывали величину $\varepsilon_{260}(P)$ по формуле $\varepsilon_{260}(P) = \frac{31,1 \cdot D_{260}}{C \cdot l}$, где C это концентрация, выраженная в г/дл или процентах, а l – длина кюветы, равная 1 см.

Концентрацию ДНК определяли по разности поглощения на 270 нм и 290 нм гидролизированных растворов ДНК по формуле $C(\%) = 50 \cdot 10^{-4}(D_{270} - D_{290})$.

В эксперименте использовали лишь те растворы, для которых коэффициент молярной экстинкции ДНК соответствовал ее нативному состоянию: $6000 < \varepsilon_{260}(P) < 7000$.

2.3. УФ – спектрофотометрия

Для анализа приготовленных комплексов ДНК и пептидов использовался метод спектрофотометрии. Это физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении спектров поглощения электромагнитного излучения в ультрафиолетовой (200 – 400 нм), видимой (400 – 760 нм) и инфракрасной (больше 760 нм) областях спектра. В спектрофотометрии исследуется зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины волны. [18] Эксперимент проводился в ультрафиолетовой области, так как ДНК не поглощает при длинах волн более 300 нм и имеет максимум поглощения на длине волны в 260 нм. В работе регистрировался спектр поглощения: зависимость коэффициента поглощения D от длины волны λ . По изменению спектров при длинах волн более 240 нм (вне поглощения пинеалона, эпителина и бронхогена) вблизи

максимума поглощения ДНК можно было судить о влиянии пептидов на спектральные свойства молекулы ДНК в растворе.

Соединения, содержащие хромофорные ($C=C$, $C=O$) и ауксохромные (OCH_3 , OH , NH_2) группы, поглощают свет в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Поглощение излучения биологическими макромолекулами в этих областях связано с возбуждением электронов n -орбиталей и связывающих молекулярных орбиталей и переходами их в возбужденные состояния на разрыхляющие орбитали: $\pi-\pi^*$ и $n-\pi^*$. [18-21] Переходы $\sigma-\sigma^*$, $n-\sigma^*$ лежат в области длин волн менее 190 нм и их изучение требуют специальных процедур для исключения влияния воды и воздуха.

Хромофорные группы, не взаимодействующие друг с другом, поглощают излучение независимо. В случае взаимодействия аддитивность спектров между ними нарушается. Например, если сумма отдельных спектров ДНК и пептида не тождественна спектру комплекса ДНК с пептидом, можно говорить об их взаимодействии с участием определенных хромофоров. По отклонениям от аддитивности можно судить о характере взаимодействия [18, 22].

Все белки поглощают в области поглощения пептидной группы $O=C-N-H$ при длинах волн 190 - 220 нм. Боковые группы аминокислотных остатков, тирозина, фенилаланина и триптофана имеют достаточно широкую полосу поглощения вблизи значений 275 - 278 нм. В этом случае поглощение происходит сопряженной плоскостью электронов тирозина, фенилаланина и триптофана. Коэффициент экстинкции белка при ≈ 280 нм зависит от количества хромофорных групп в нем, которые содержат сопряженные π -электроны. С их возбуждением связана эта полоса поглощения. Для возбуждения σ -электронов требуется больше энергии, тогда соответствующие полосы поглощения лежат в дальней ультрафиолетовой области. В нуклеиновых кислотах за поглощение отвечают гетероциклические пуриновые и пиримидиновые основания. [19, 23, 24]

Для количественного анализа спектров поглощения использовался закон Бугера-Ламберта-Бера $D = lg \frac{I_0}{I} = \epsilon l C$, где D – коэффициент поглощения (оптическая плотность), I_0 – интенсивность падающего света, I – интенсивность света, прошедшего через кювету с раствором, ϵ – коэффициент молярной экстинкции, l – длина оптического пути, равная ширине кюветы – 1 см., C – концентрация исследуемого раствора.

2.4. Плавление ДНК

В работе также проводилось плавление ДНК в присутствии эпиталона. Остановимся кратко на рассмотрении плавления ДНК.

Денатурация нуклеиновых кислот сводится к разрушению двойной спирали ДНК. Нагревание раствора нативной ДНК до достаточно высоких температур приводит к тому, что двойная спираль разделяется на две цепи, которые сворачиваются в статистические клубки. При этом уменьшается вязкость и оптическая активность, также возрастает интенсивность поглощения в области 260 нм.

Плавление двойной спирали ДНК представляет собой кооперативный конформационный (не фазовый) переход. Присутствующие в растворе лиганды могут перераспределяться по цепи ДНК в процессе плавления. Они могут действовать в качестве “скрепок”, стабилизирующих двойную спираль, или, напротив, ослаблять водородные связи между основаниями. Температура плавления ДНК – это температура, при которой 50% от “плавящейся” ДНК переходит в денатурированное состояние.

Термодинамические характеристики плавления ДНК были ранее подробно изучены методом микрокалориметрии. Теплота в температуре плавления достаточно сильно зависит от рН и ионной силы раствора. По некоторым сведениям при возрастании рН от 7,0 до 9,7 температура плавления убывает от 84,8 до 66,3 °С (в физиологических условиях), и при убывании рН от 5,4 до 3,2 температура плавления убывает от 84 до 55 °С. Из теоретических расчетов для реальных молекул ДНК со случайной последовательностью нуклеотидов при физиологических условиях получается, что ширина интервала плавления ДНК равна от 2,5 до 3 °С. [25]

Для исследования плавления ДНК использовался спектрофотометр SPECORD 200 Plus, в котором предусмотрена функция автоматически настраиваемого нагрева и охлаждения кюветы с раствором.

Часть 3. Результаты и обсуждение

Как было сказано выше, целью данной работы является анализ возможности взаимодействия исследуемых коротких пептидов с молекулой ДНК и, при положительном результате, определение их модели связывания и влияния на конформацию молекулы ДНК *in vitro*.

В результатах измерений комплексов с короткими пептидами зафиксировано изменение спектральных свойств ДНК. Эпиталон, пинеалон и бронхоген не поглощают в диапазоне длин волн более 240 нм (в области от 240 до 300 нм за поглощение растворов ДНК с пептидами отвечают только азотистые основания макромолекулы ДНК). Для панкрагена необходимо учитывать вклад поглощения самого пептида (спектр его поглощения пересекается с полосой поглощения ДНК). Остановимся подробно на рассмотрении экспериментальных результатов.

3.1. Исследование взаимодействия молекулы ДНК с AEDG (эпиталон)

Спектральными методами было изучено влияние тетрапептида AEDG на вторичную структуру молекулы ДНК. Помимо описанной выше УФ-спектрофотометрии было проведено плавление ДНК в растворе с пептидом. В работе регистрировали спектры поглощения растворов ДНК с постоянной ее концентрацией $C_{\text{ДНК}} = 3 \cdot 10^{-5}$ М при вариации содержания пептида (в работе мы пользуемся отношением молярных концентраций пептида и ДНК, для которой концентрация выражается в молях пар оснований). С данным пептидом проведены по одной серии измерений с плавлением ДНК (Рис. 3.1.2) и спектрофотометрией комплексов сразу же после приготовления растворов (Рис. 3.1.1). Анализ данных показал, что взаимодействие пептида AEDG и ДНК в растворе хлорида натрия с молярной концентрацией 5мМ проявлялось сразу после приготовления растворов. Связывание пептида с ДНК привело к гиперхромному эффекту, свидетельствовавшему о частичной дестабилизации вторичной структуры макромолекулы. Сходные изменения в спектре поглощения ДНК наблюдаются при связывании катионов с N7 гуанина [26].

Можно сделать заключение, что атом N7 гуанина большой бороздки являлся первым местом связывания, предпочтительным для пептида. После оккупации всех возможных сайтов связывания этого типа взаимодействие пептида с ДНК приводило к дестабилизации вторичной структуры ДНК, локальному разрушению стэкинга оснований, что проявлялось в возникновении гиперхромного эффекта. Были установлены две тенденции в зависимости оптической плотности растворов от концентрации пептида. В области максимума полосы

(Рис. 3.1.1 в) сначала наблюдалось некоторое уменьшение величины оптической плотности. С увеличением концентрации эпیتالона, происходило постепенное увеличение оптической плотности за счет дестабилизации вторичной структуры ДНК.

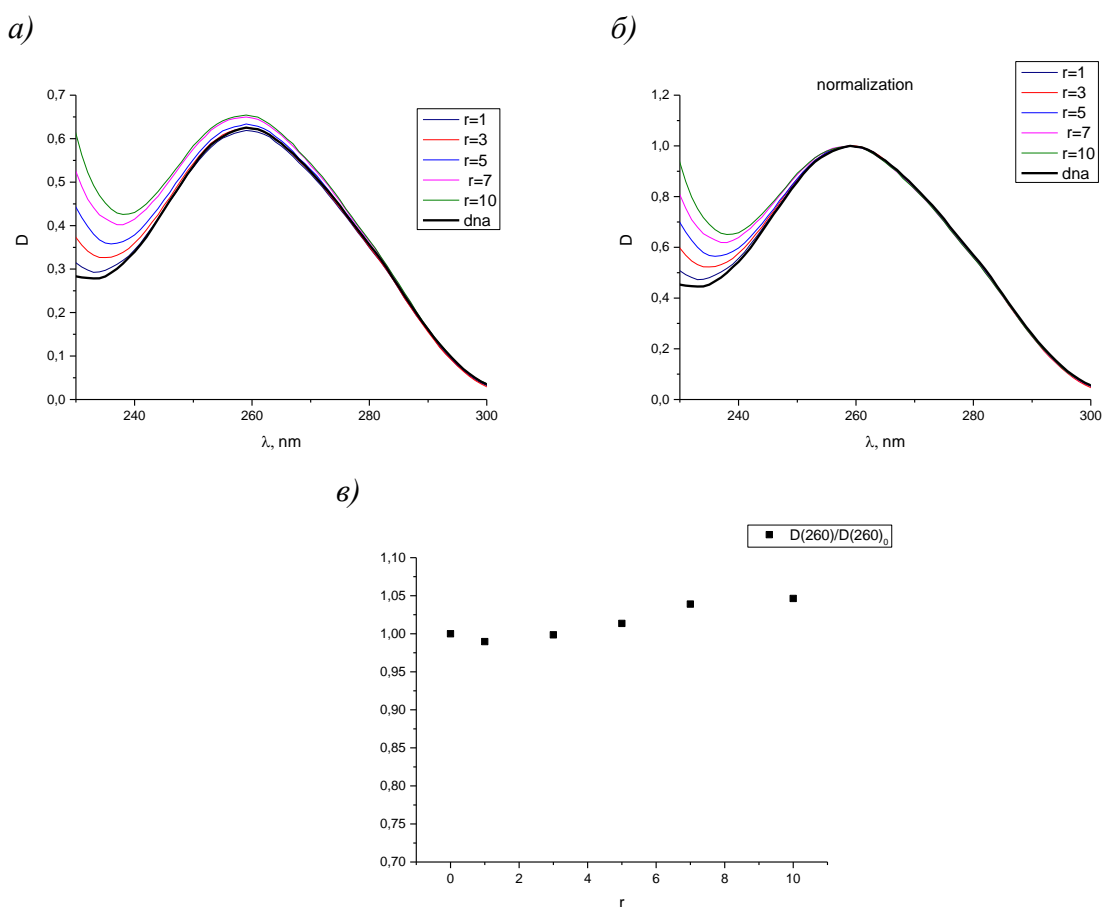


Рис. 3.1.1 Спектры поглощения ДНК с эпیتالоном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в). Спектры получены сразу после приготовления растворов.

Для плавления (Рис. 3.1.2) использовался комплекс с соотношением концентраций эпیتالона и ДНК равным десяти. Готовый комплекс и контрольный раствор ДНК с нулевым содержанием пептида нагревали с 25 °С до 90 °С с шагом в 2 °С. Регистрировались кривые плавления (зависимость коэффициента поглощения от температуры $D(T)$) при длине волны в 260 нм. Из анализа этих кривых следует, что температура плавления контрольной ДНК составила 65 °С, а в присутствии эпیتالона 60 °С.

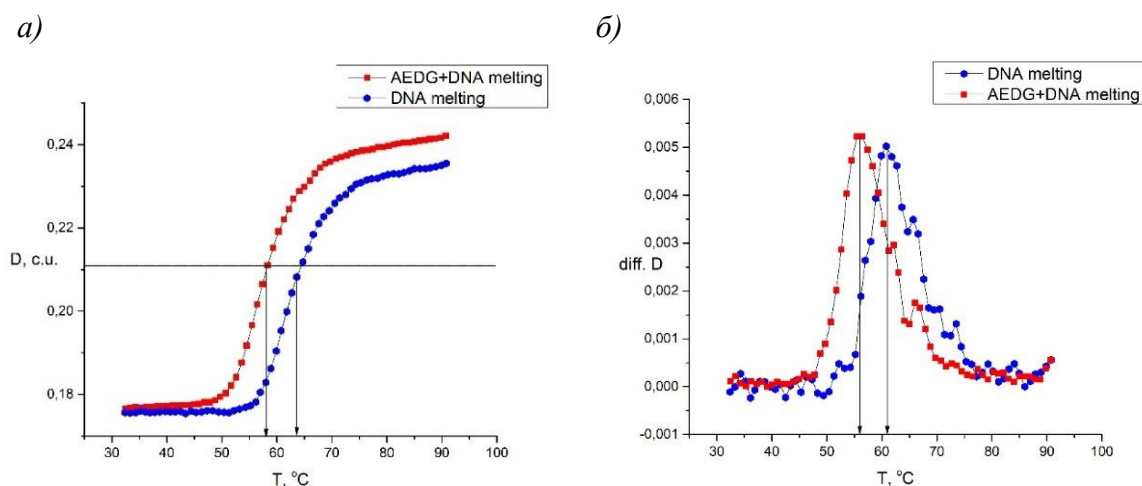


Рис. 3.1.2 Кривые плавления ДНК и комплекса с эпителином: обычная зависимость $D(T)$ (а) и дифференцированная (б). Стрелками указаны температуры плавления.

Таким образом, при образовании комплекса ДНК с эпителином при используемых концентрациях понижается температура плавления, что свидетельствует о снижении энергетических затрат на разрушение водородных связей при денатурации ДНК в присутствии пептида.

3.2. Исследование взаимодействия молекулы ДНК с EDR (пинеалон)

Пинеалон представляет собой пептид с тремя аминокислотами. При нейтральных рН пептид имеет отрицательный суммарный заряд. Можно полагать, что для взаимодействия в растворе с отрицательно заряженной ДНК необходимо его приближение к макромолекуле в результате теплового движения. Присутствие в растворе низкомолекулярной соли (5 мМ) NaCl обеспечивает определенную экранировку зарядов фосфатных групп ДНК и заряженных групп пептида, что позволяет при их сближении предположить ион-дипольное взаимодействие пептида с ДНК (пептид при этом должен обладать ненулевым дипольным моментом). В работе регистрировали спектры поглощения растворов ДНК с постоянной ее концентрацией $C_{\text{ДНК}} = 3 \cdot 10^{-5}$ М при вариации содержания пептида (в работе мы пользуемся отношением молярных концентраций пептида и ДНК, для которой концентрация выражается в молях пар оснований). С данным пептидом проведены по три серии измерений: измерения проведены сразу же после приготовления растворов (Рис. 3.2.1); измерения тех же растворов проведены через два часа после приготовления (Рис. 3.2.2) и через сутки после приготовления растворов (Рис. 3.2.3).

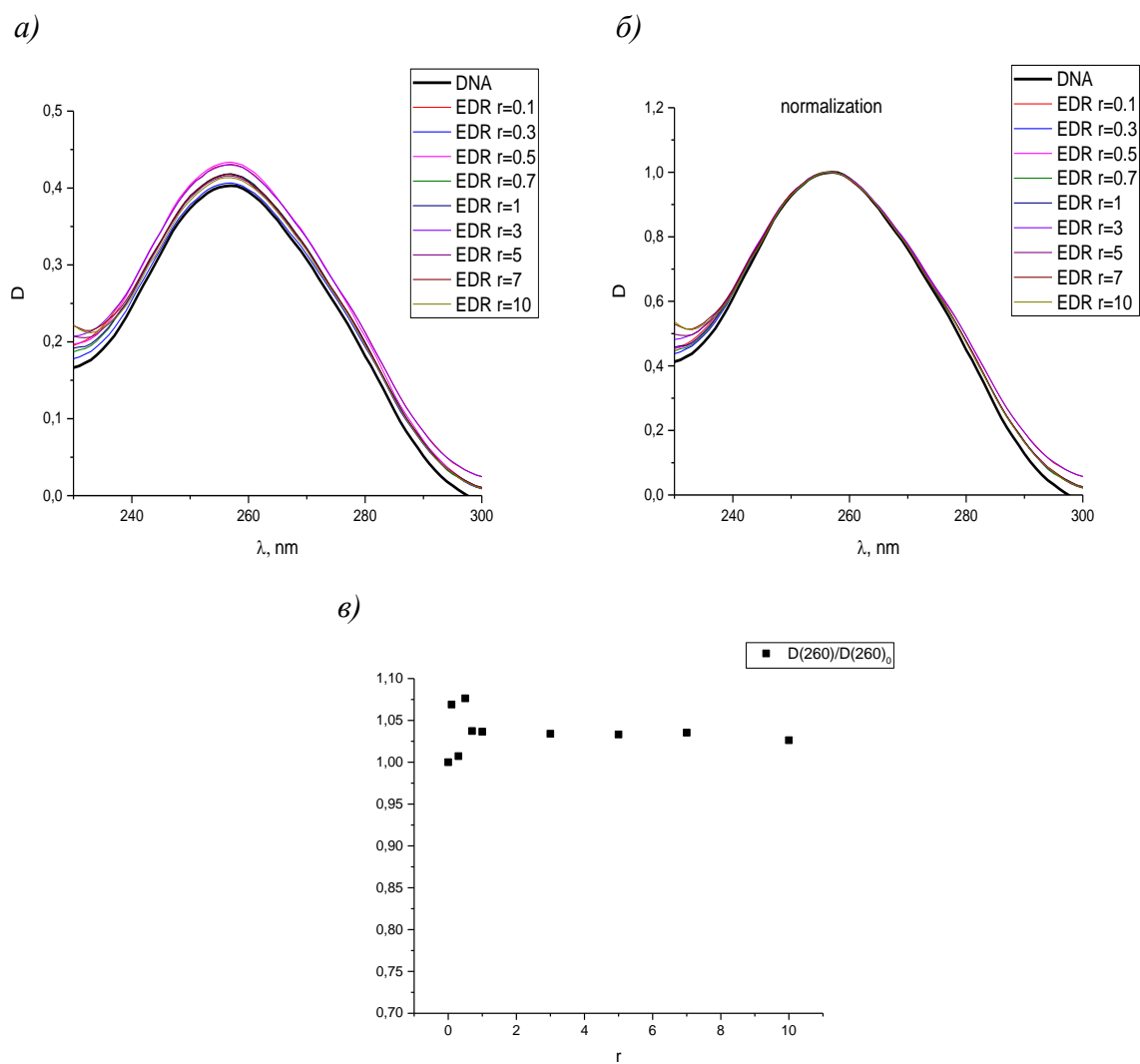


Рис. 3.2.1 Спектры поглощения ДНК с пинеалоном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в). Спектры получены сразу после приготовления растворов.

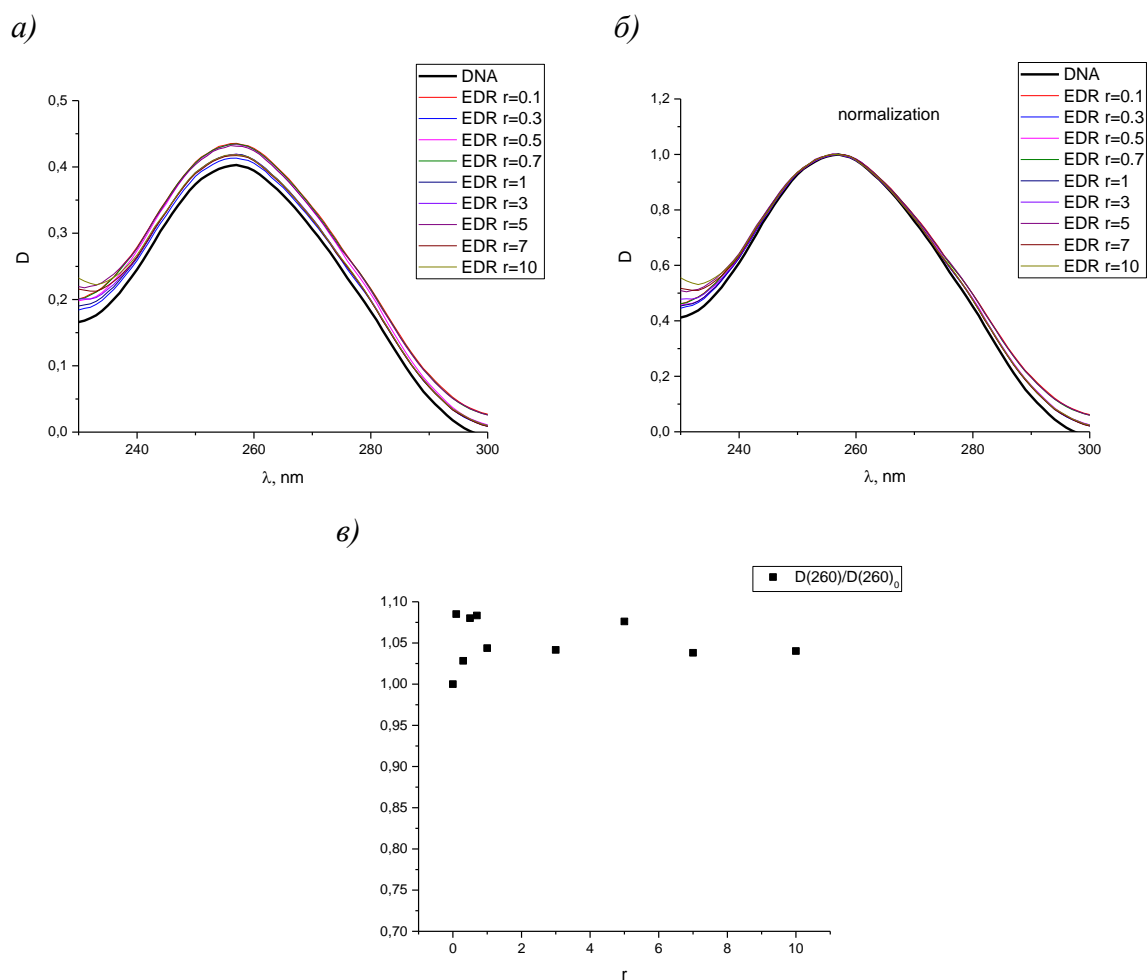


Рис. 3.2.2 Измерения спектров растворов через 2 часа после приготовления: спектры поглощения ДНК с тинеалоном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в).

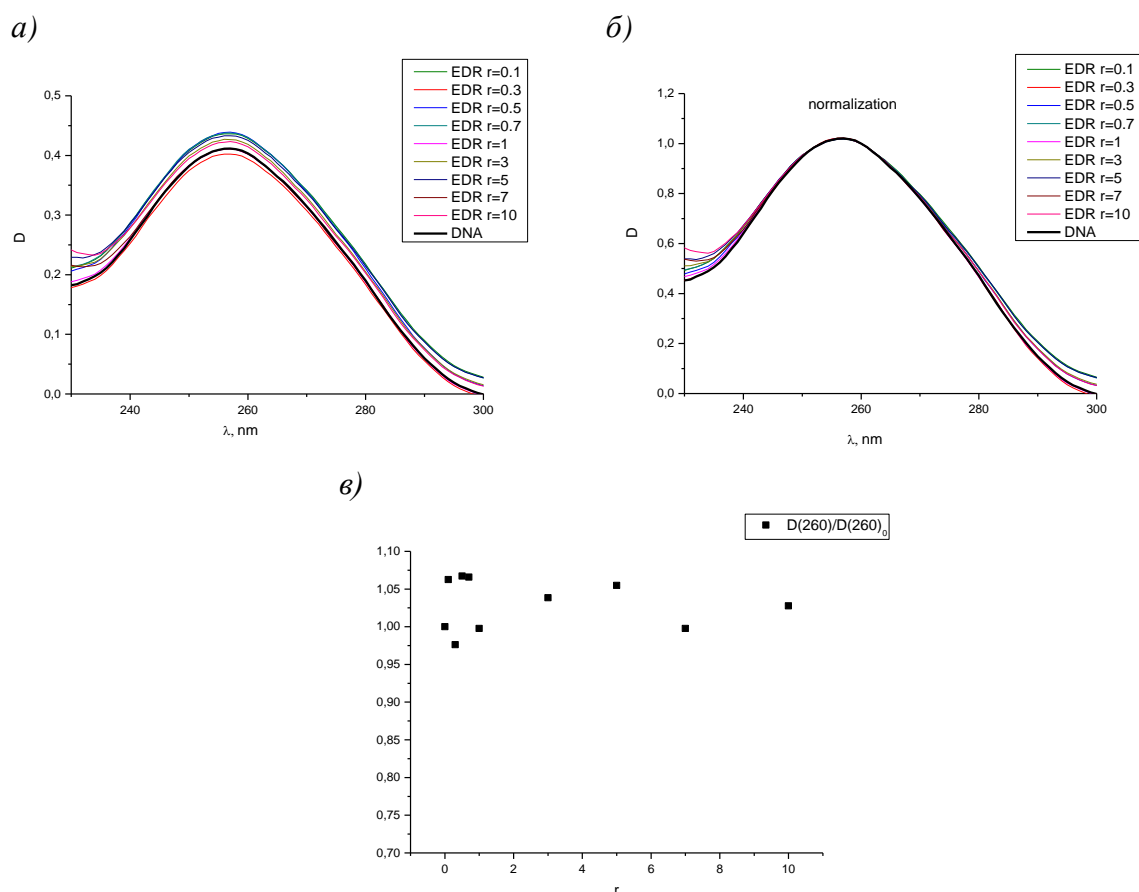


Рис. 3.2.3 Измерения спектров тех же растворов через сутки после их приготовления: спектры поглощения ДНК с пинеалоном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в).

На рисунке 3.2.4 сведены данные описанного выше исследования таких систем. Согласно рисунку 3.2.4, тенденция к появлению гиперхромного эффекта при малых r наблюдается сразу после приготовления систем. Она сохраняется и после суток хранения растворов. Такие исследования были проведены трижды. На рисунках 3.2.6-3.2.8 представлены данные трех независимых приготовлений систем.

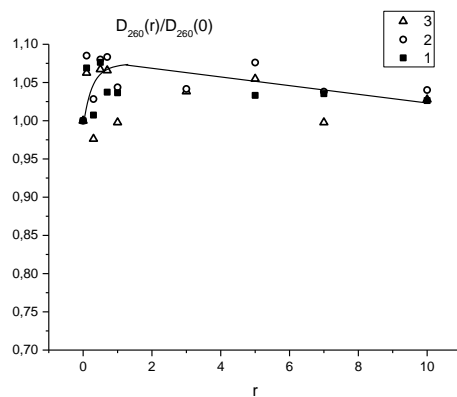


Рис. 3.2.4 Результаты измерений, представленные на рис. 3.2.1-3.2.3, как зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r .

На риунке 3.2.5 представлены усредненные данные по трем сериям для каждого измерения.

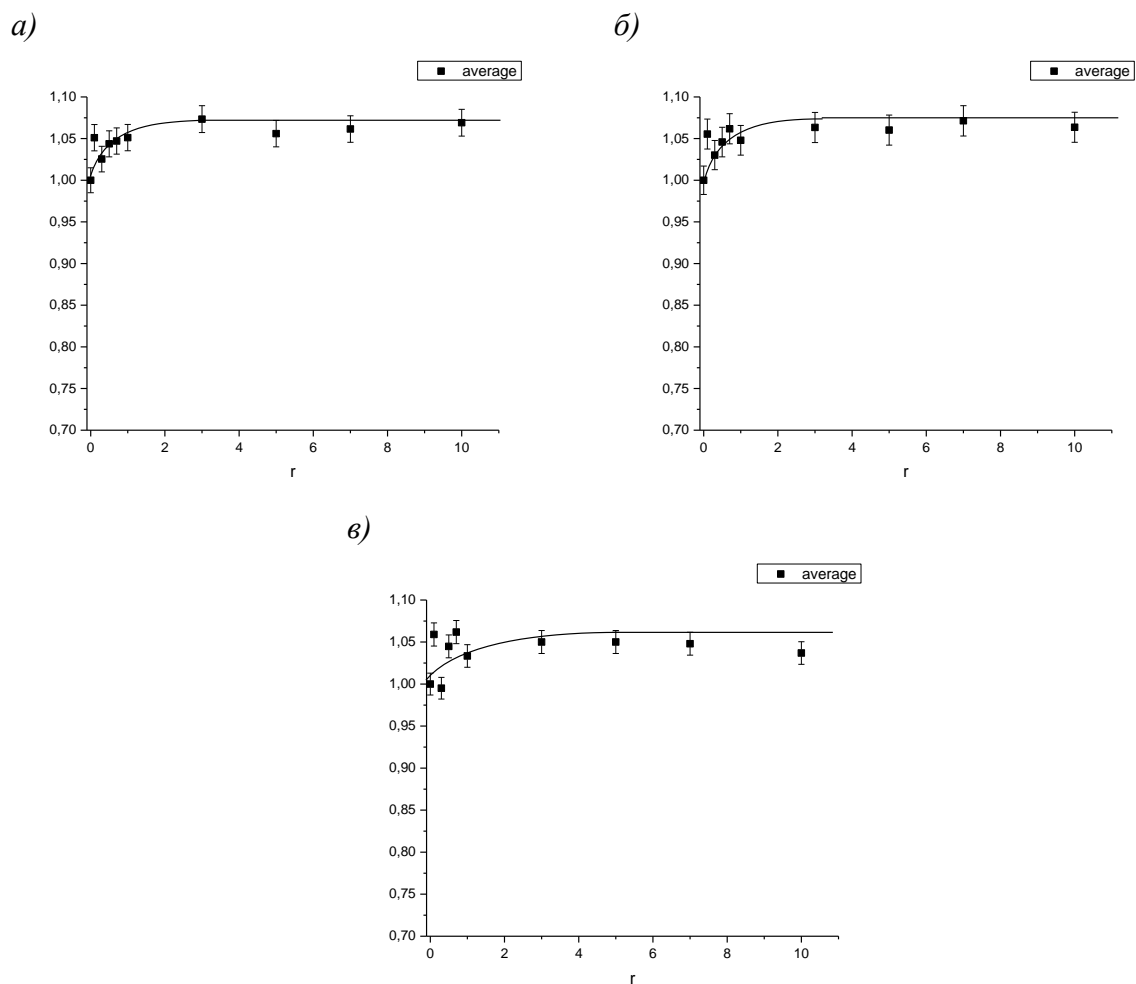


Рис. 3.2.5 Сведенные результаты трех серий измерений: сразу после приготовления растворов (а), через два часа (б) и через сутки (в). Все данные усреднены с погрешностью не более 1,8 %.

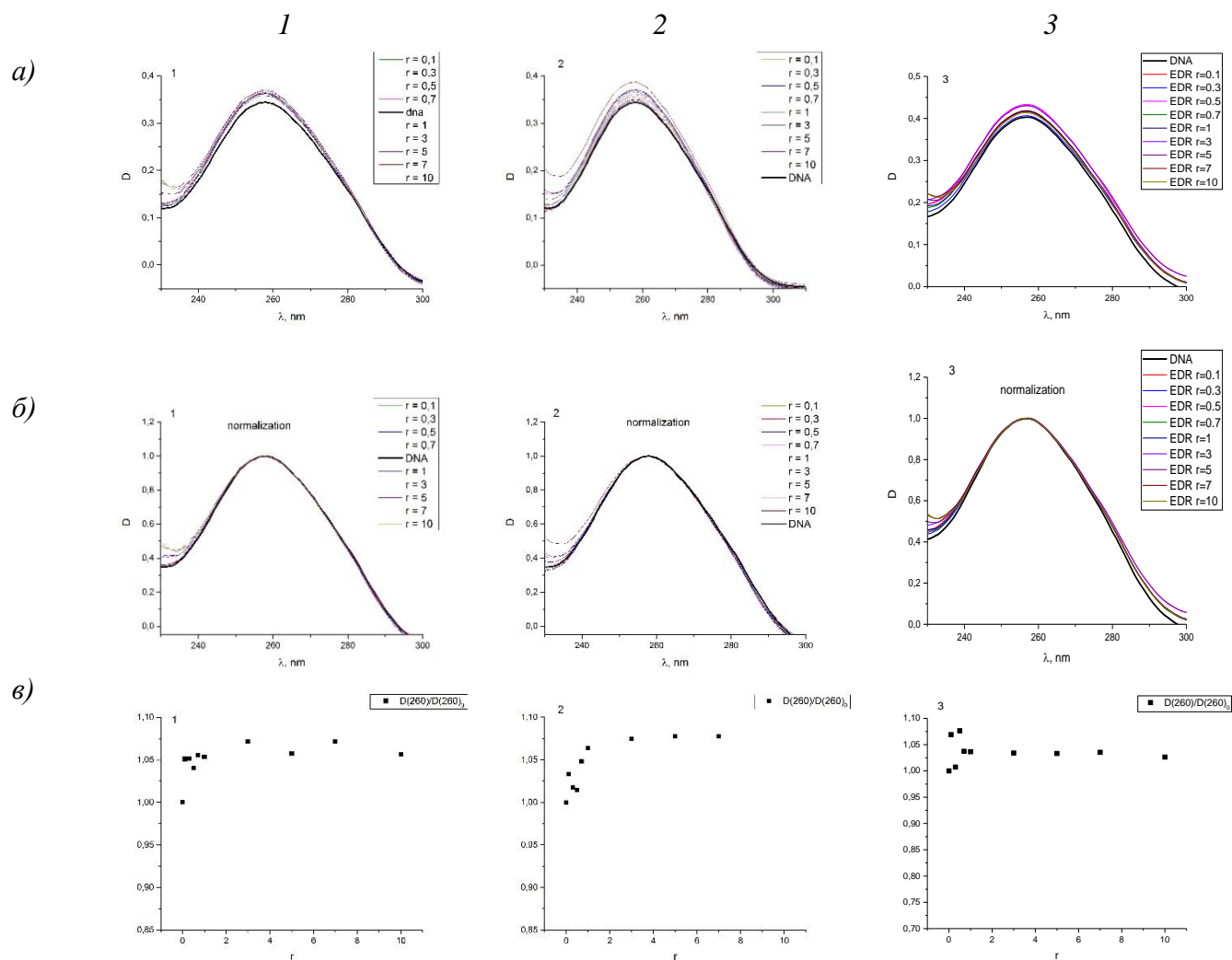


Рис. 3.2.6 Результаты спектрофотометрии трех независимых систем (данные отмечены значками, пронумерованными как 1, 2 и 3). Измерения проведены сразу после приготовления. Спектры поглощения ДНК с пинеалоном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в).

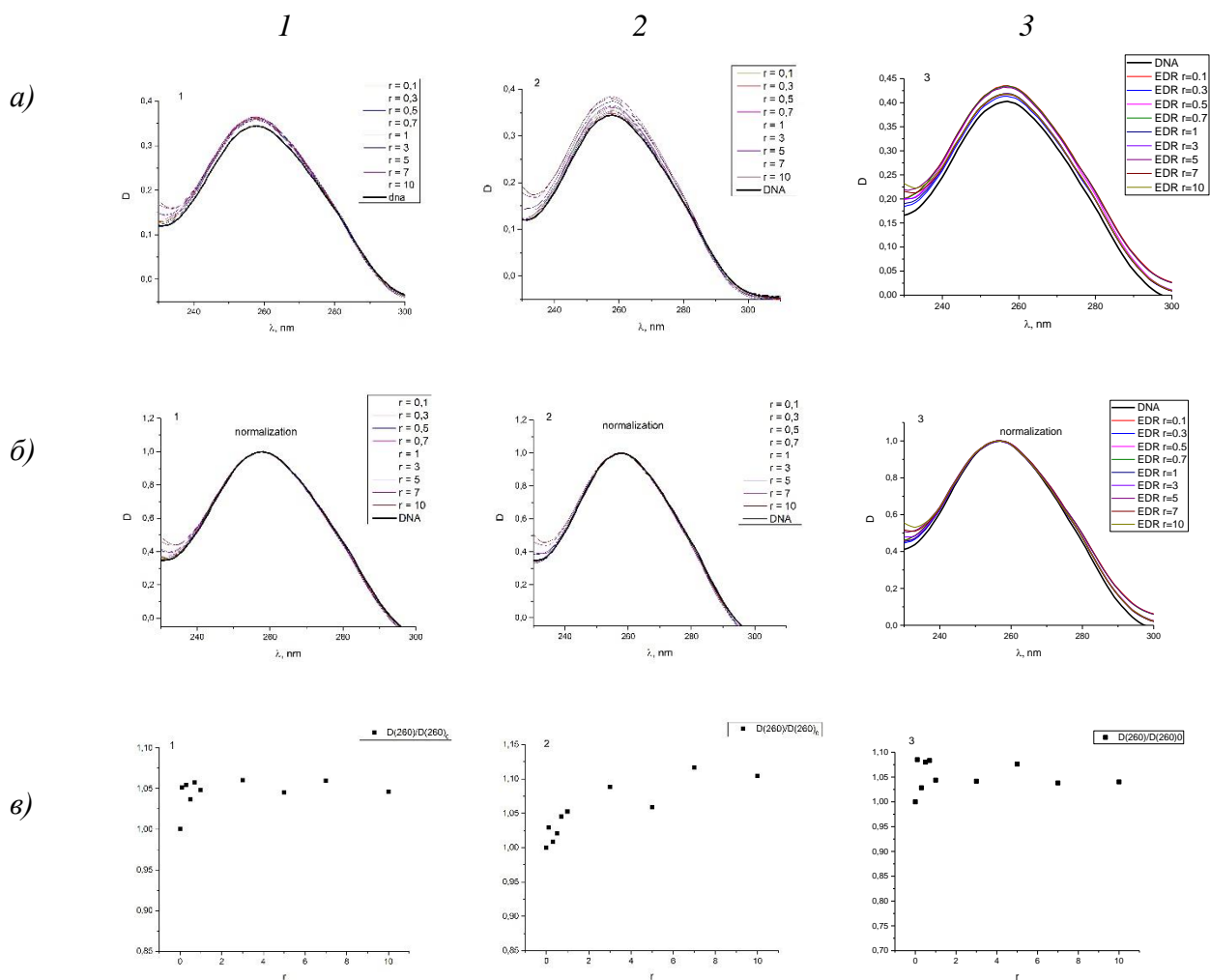


Рис. 3.2.7 Результаты спектрофотометрии трех независимых систем (данные отмечены значками, пронумерованными как 1, 2 и 3). Измерения проведены через 2 часа после приготовления. Спектры поглощения ДНК с пинеалоном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в).

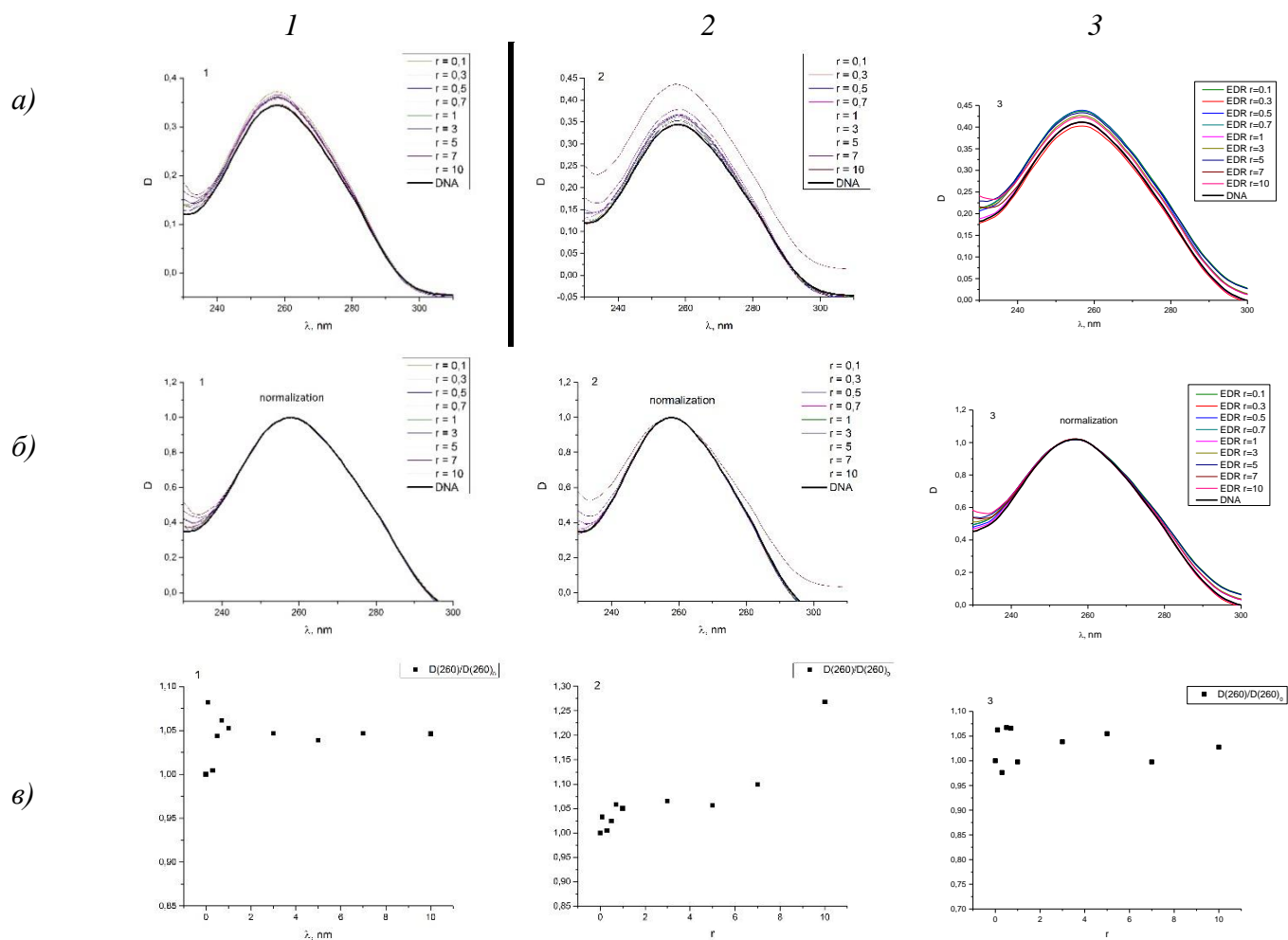


Рис. 3.2.8 Результаты спектрофотометрии трех независимых систем (данные отмечены значками, пронумерованными как 1, 2 и 3). Измерения проведены через сутки после приготовления. Спектры поглощения ДНК с пинеалоном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в).

На основании рассмотренных данных можно сделать следующие выводы. Изменения в спектре поглощения ДНК при добавлении в ее раствор пинеалона незначительны, они проявляются сразу. В таких системах спектральные свойства ДНК со временем меняются мало. Об изменениях в спектре поглощения ДНК свидетельствует отличие в длинноволновой области нормированных спектров. В этом пептиде нет ароматических аминокислот, так что изменения после 240 нм связаны только с изменением спектральных свойств ДНК в присутствии пептида. Суммарный заряд у пептида отрицательный. Глутаминовая и аспаргиновая кислоты дают при нейтральных рН “-2”. Аргинин - это плюс. На концах пептида карбоксильная группа дает минус, еще присутствует плюс с N конца. Возможно, пептид действует как диполь. Тогда с отрицательной ДНК возможно ион-дипольное взаимодействие. После привлечения пептида к ДНК могут формироваться, например, водородные связи. Или простое Ван-дер-Ваальсово взаимодействие отдельных групп с ДНК формирует комплекс.

3.3. Исследование взаимодействия молекулы ДНК с AEDL (бронхоген)

Бронхоген отличается от эпиталона боковым аминокислотным остатком: глицин у эпиталона, лейцин у бронхогена. С помощью УФ-спектрофотометрии было изучено влияние пептида AEDL на вторичную структуру молекулы ДНК в растворе хлорида натрия с молярной концентрацией 5 мМ. В работе регистрировали спектры поглощения растворов ДНК с постоянной ее концентрацией $C_{\text{ДНК}} = 3 \cdot 10^{-5}$ М при вариации содержания пептида (в работе мы пользуемся отношением молярных концентраций пептида и ДНК, для которой концентрация выражается в молях пар оснований). С данным пептидом проведены по три серии измерений. На рисунках 3.3.1-3.3.3 представлены спектры поглощения в день приготовления комплекса, через два часа и через сутки.

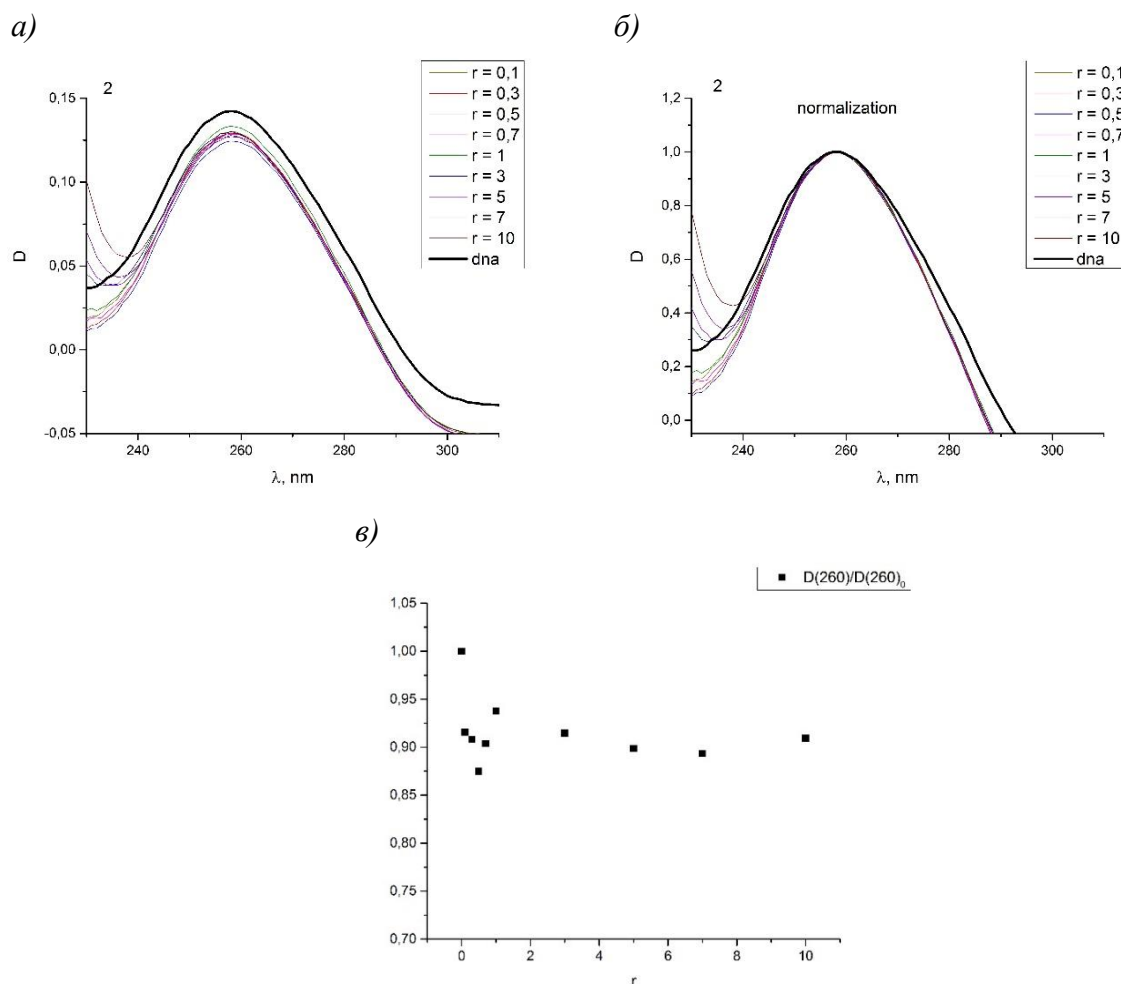


Рис. 3.3.1 Спектры поглощения ДНК с бронхогеном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в). Спектры получены сразу после приготовления растворов.

Анализ данных показал, что взаимодействие пептида AEDL и ДНК в растворе хлорида натрия с молярной концентрацией 5М проявлялось сразу после приготовления растворов. Связывание пептида с ДНК привело к небольшому гипохромному эффекту. Можно сказать, что бронхоген не оказывает существенного дестабилизирующего эффекта на макромолекулу ДНК.

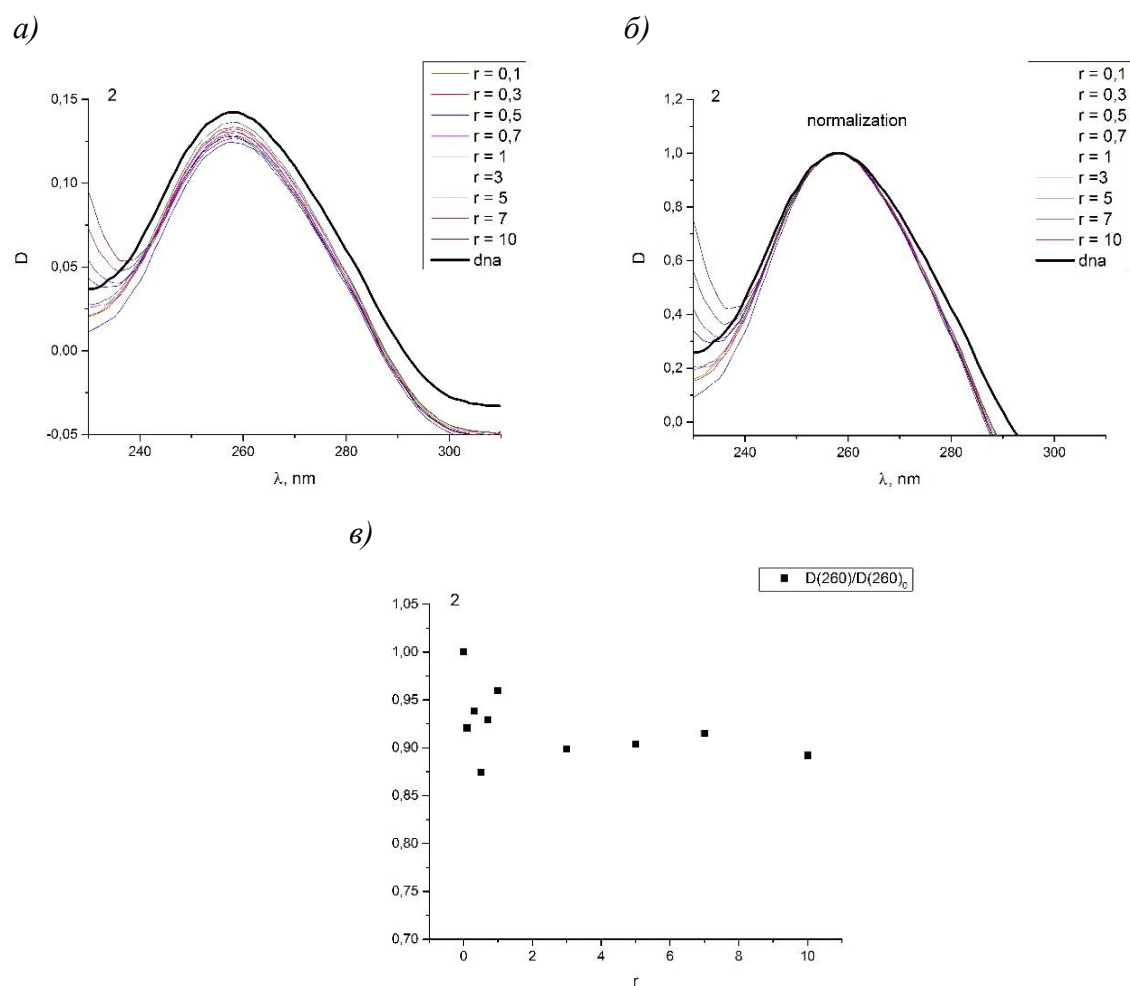


Рис. 3.3.2 Измерения спектров растворов через 2 часа после приготовления: спектры поглощения ДНК с бронхогеном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в).

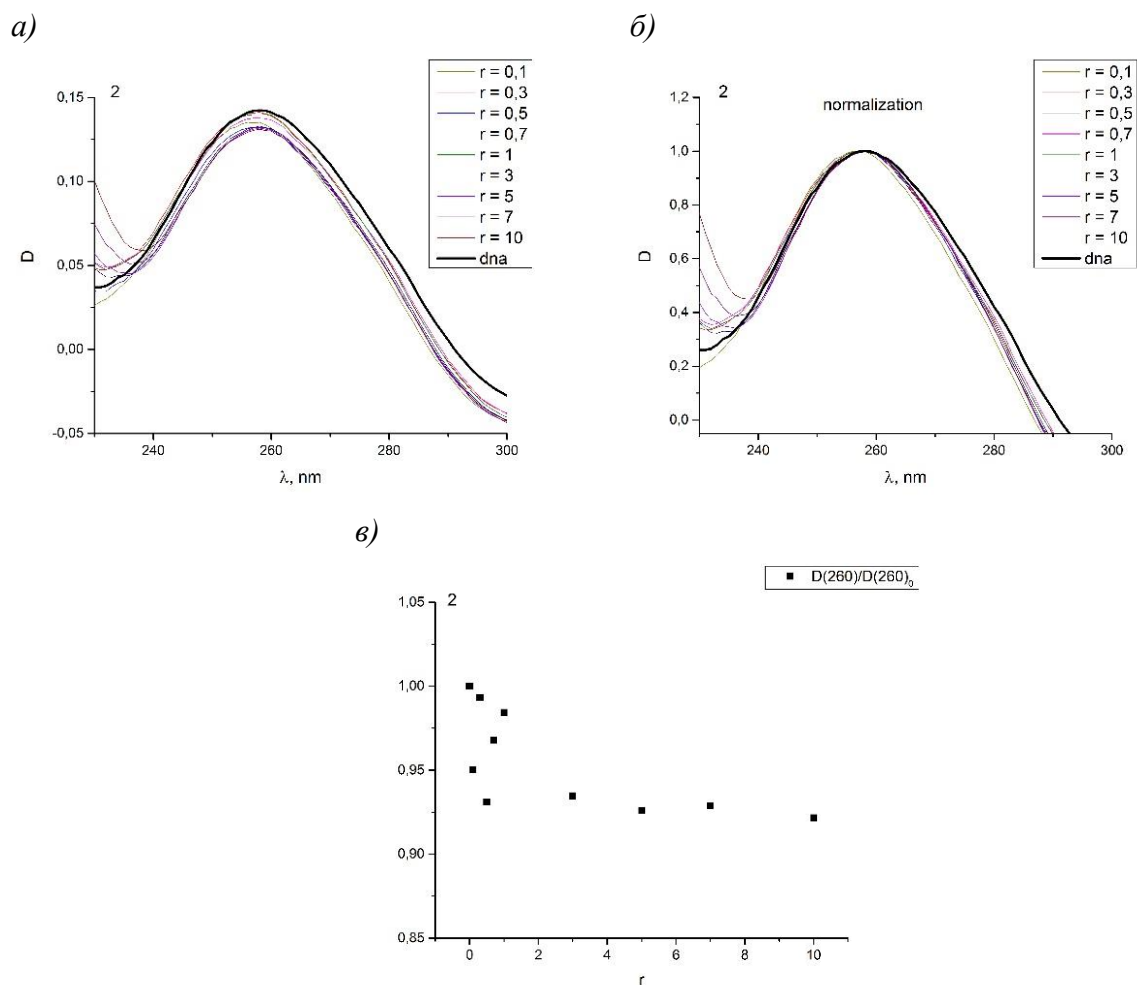


Рис. 3.3.3 Измерения спектров тех же растворов через сутки после их приготовления: спектры поглощения ДНК с бронхогеном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в).

На рисунке 3.3.4 сведены данные описанного выше исследования таких систем. Согласно рисунку 3.3.4, тенденция к появлению гипохромного эффекта при малых r наблюдается сразу после приготовления систем. Она сохраняется и после суток хранения растворов. Такие исследования были проведены трижды.

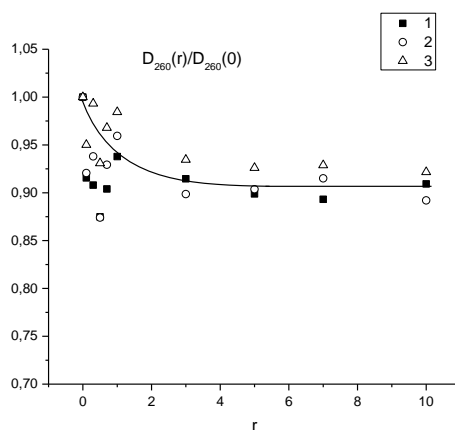


Рис. 3.3.4 Результаты измерений, представленные на рис. 3.3.1-3.3.3, как зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r .

При малых концентрациях бронхогена наблюдалось увеличение гипохромного эффекта на длине волны 260 нм (Рис. 3.3.4). Последующее увеличение концентраций пептида в комплексе с ДНК не приводило к росту величины гипохромного эффекта на спектрах, что могло свидетельствовать об оккупации всех возможных сайтов связывания на ДНК.

На рисунке 3.3.5 представлены усредненные данные по трем сериям для каждого измерения. На них видно, что гипохромный эффект в значительной мере проявляется на следующий день.

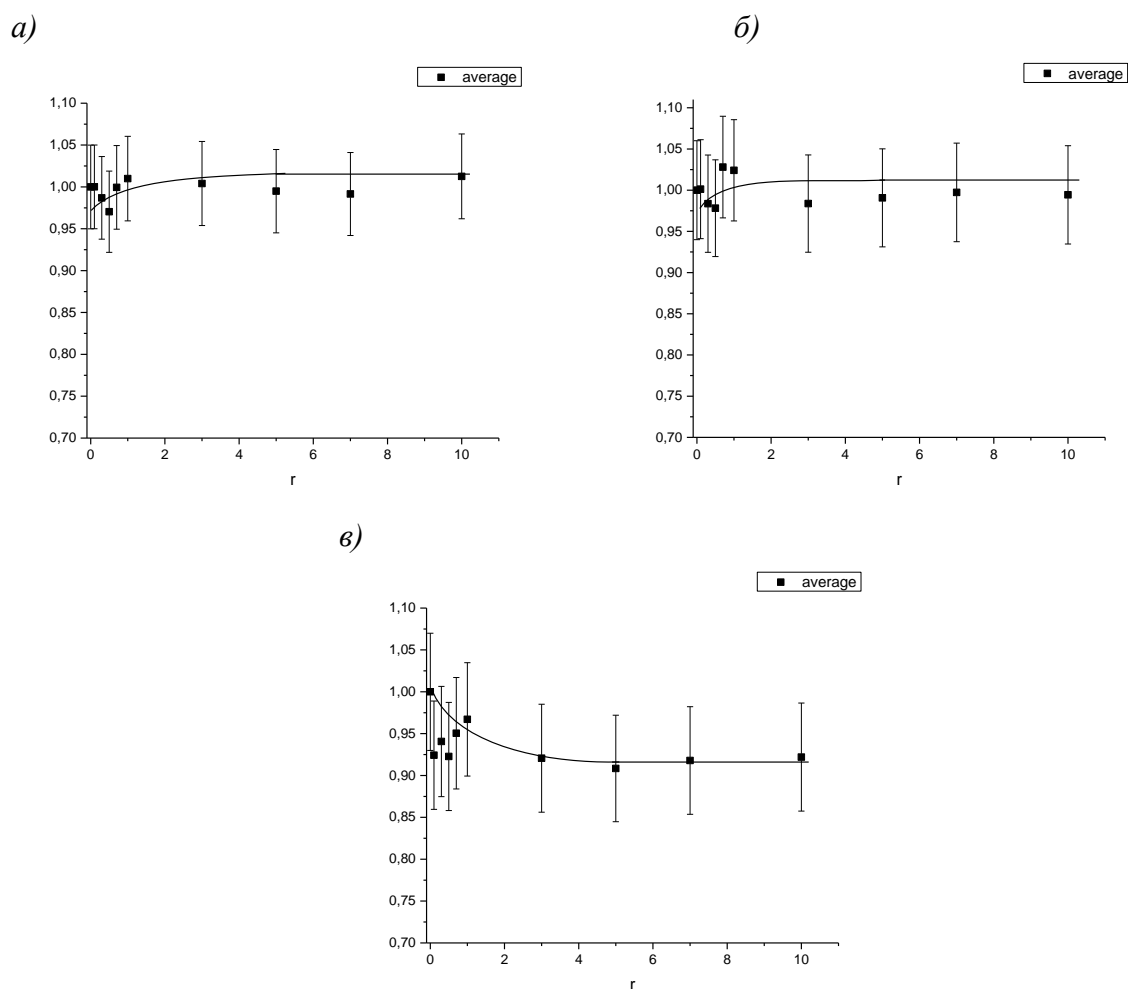


Рис. 3.3.5 Сведенные результаты трех серий измерений: сразу после приготовления растворов (а), через два часа (б) и через сутки (в). Все данные усреднены с погрешностью не более 8 %.

Можно сделать предположение, что бронхоген связывается с азотистыми основаниями ДНК, причем предполагаемым местом связывания с ДНК является атом N7 гуанина в большой бороздке. Подобный характер спектральных изменений наблюдался при протонировании ДНК по N7 гуанина [26].

Наблюдается сходство в позиции связывания эпиталона и бронхогена с ДНК, но при этом они оказывают разное по степени воздействие на стабильность вторичной структуры макромолекулы.

Далее на рисунках 3.3.6-3.3.8 представлены данные трех независимых приготовлений систем.

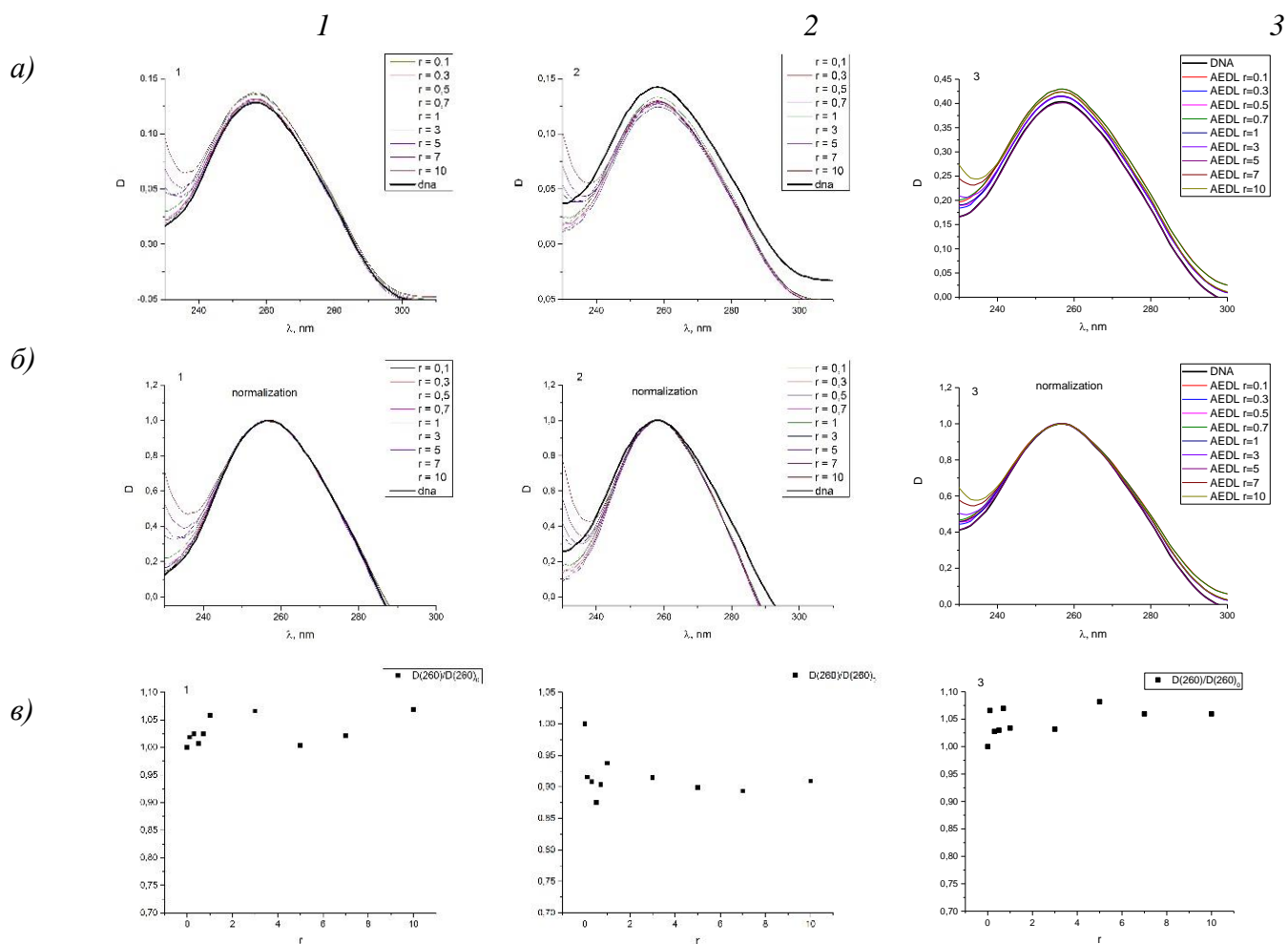


Рис. 3.3.6 Результаты спектрофотометрии трех независимых систем (данные отмечены значками, пронумерованными как 1, 2 и 3). Измерения проведены сразу после приготовления. Спектры поглощения ДНК с бронхогеном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в).

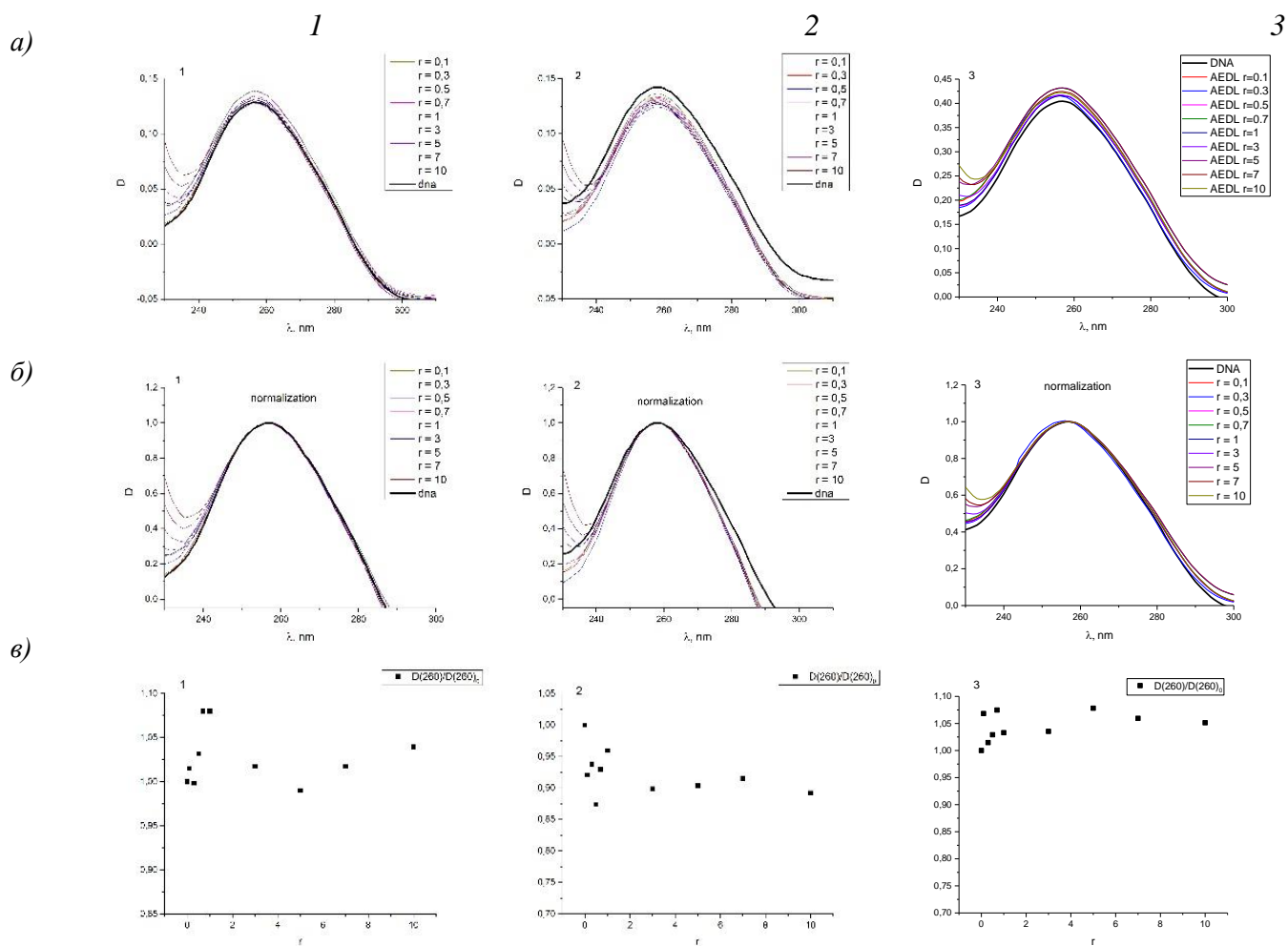


Рис. 3.3.7 Результаты спектрофотометрии трех независимых систем (данные отмечены значками, пронумерованными как 1, 2 и 3). Измерения проведены через 2 часа после приготовления. Спектры поглощения ДНК с бронхогеном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в).

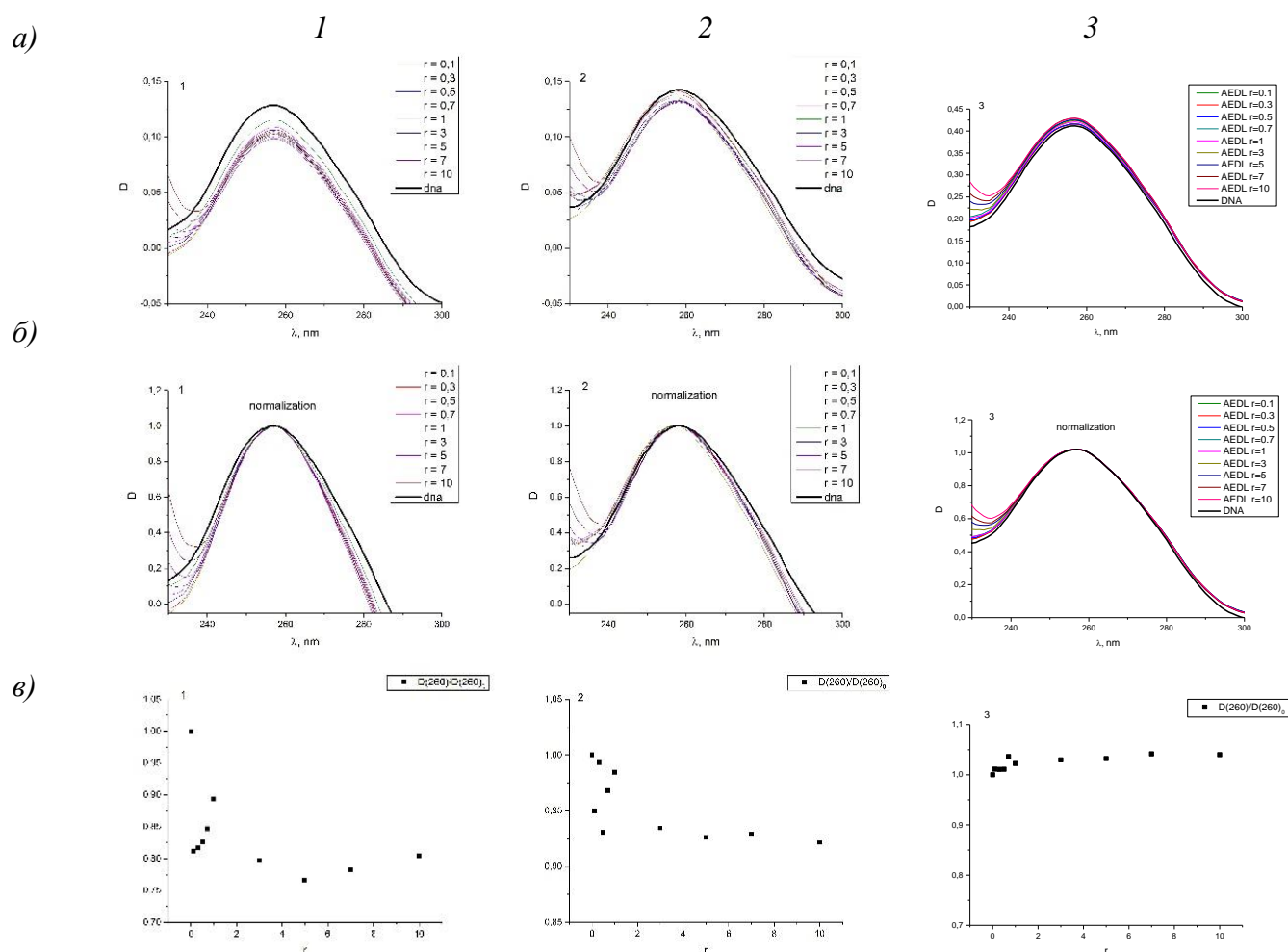


Рис. 3.3.7 Результаты спектрофотометрии трех независимых систем (данные отмечены значками, пронумерованными как 1, 2 и 3). Измерения проведены через сутки после приготовления. Спектры поглощения ДНК с бронхогеном при разных r (а), те же спектры, нормализованные на максимум поглощения ДНК (б) и зависимость относительного изменения амплитуды полосы поглощения ДНК от r (в).

3.4. Исследование взаимодействия молекулы ДНК с KEDW (панкраген)

В случае с пептидом KEDW в рассматриваемой спектральной области поглощают и панкраген (он содержит ароматическую кислоту триптофан), и ДНК. С панкрагеном было проведено по три независимых серии измерений: после приготовления растворов, через два часа и на следующий день (Рис. 3.4.1). В предположении, что спектр ДНК в присутствии пептида не изменяется, из спектров, полученных для смеси пептида и ДНК, вычтено поглощение ДНК (Рис. 3.4.2).

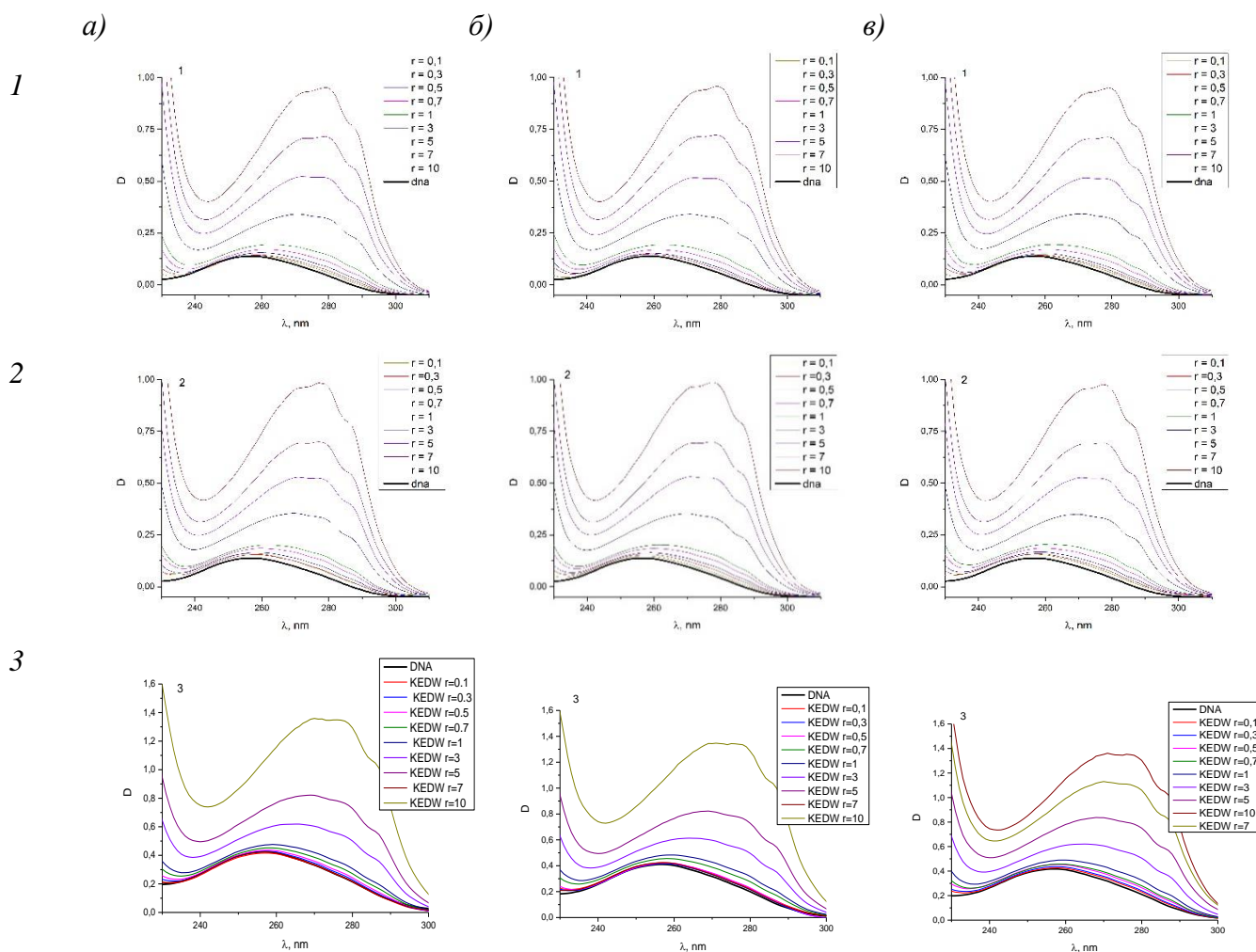


Рис. 3.4.1 Результаты спектрофотометрии трех независимых систем (данные отмечены значками, пронумерованными как 1, 2 и 3). Спектры поглощения ДНК с панкреатеном при разных r , полученные после приготовления растворов (а), через два часа (б) и через сутки (в).

Существенное увеличение концентрации пептида в растворе ДНК приводит к тому, что в спектре проявляется, в основном, состояние свободного пептида. Спектральные изменения, характерные для пептида в комплексе с ДНК, просто не видны на фоне спектров для огромного количества свободного пептида.

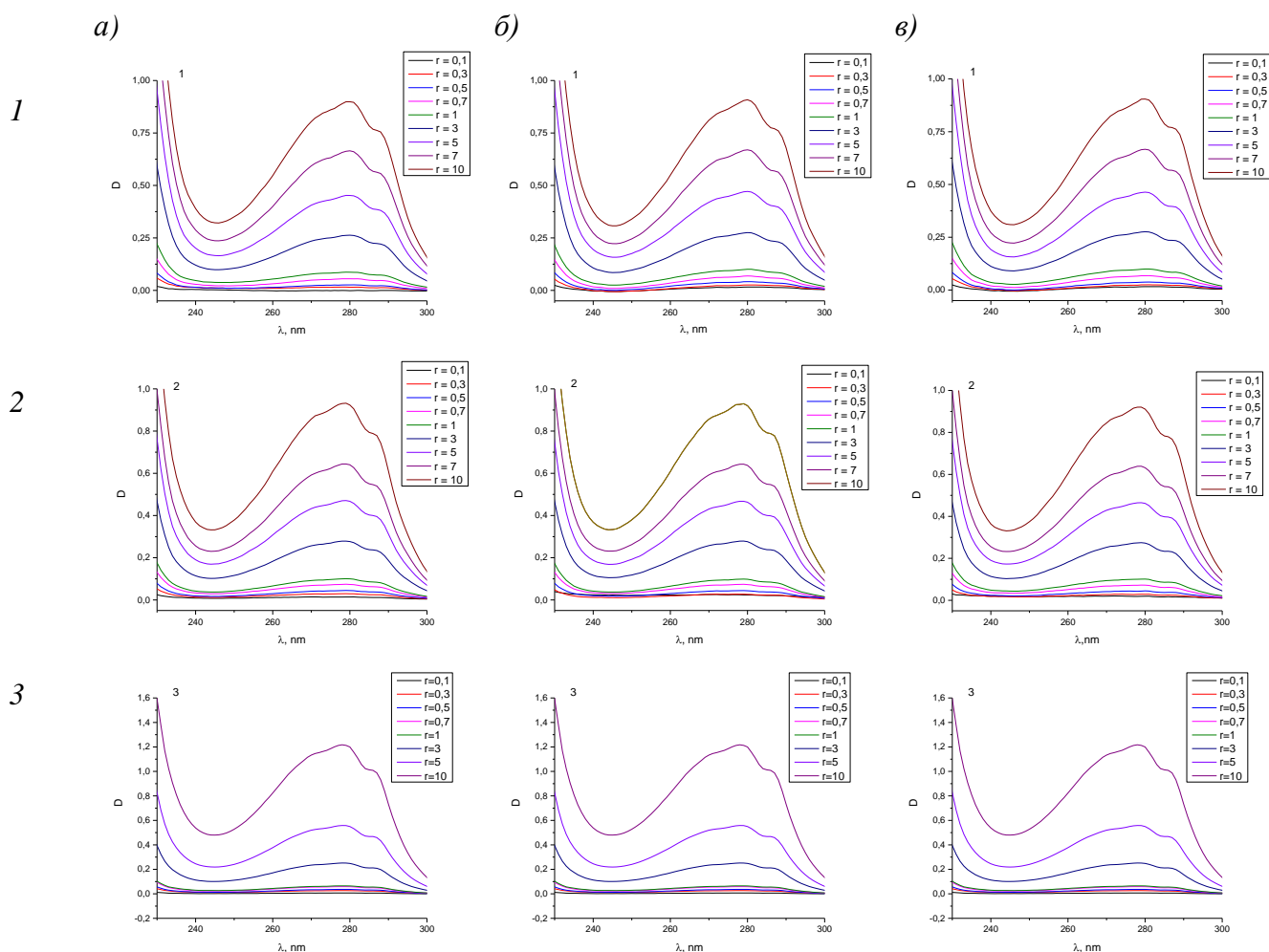


Рис. 3.4.2 Спектры панкреатина различной концентрации: полученные после приготовления растворов (а), через два часа (б) и через сутки (в). Системы пронумерованы (1-3).

Нормируя полосу на максимум поглощения ДНК, получим относительное изменение спектральных свойств пептида при связывании (рис. 3.4.3). Из рисунка видно, что вид спектра соединения в присутствии ДНК меняется. В данном эксперименте максимальные изменения фиксируются при $r = 10$.

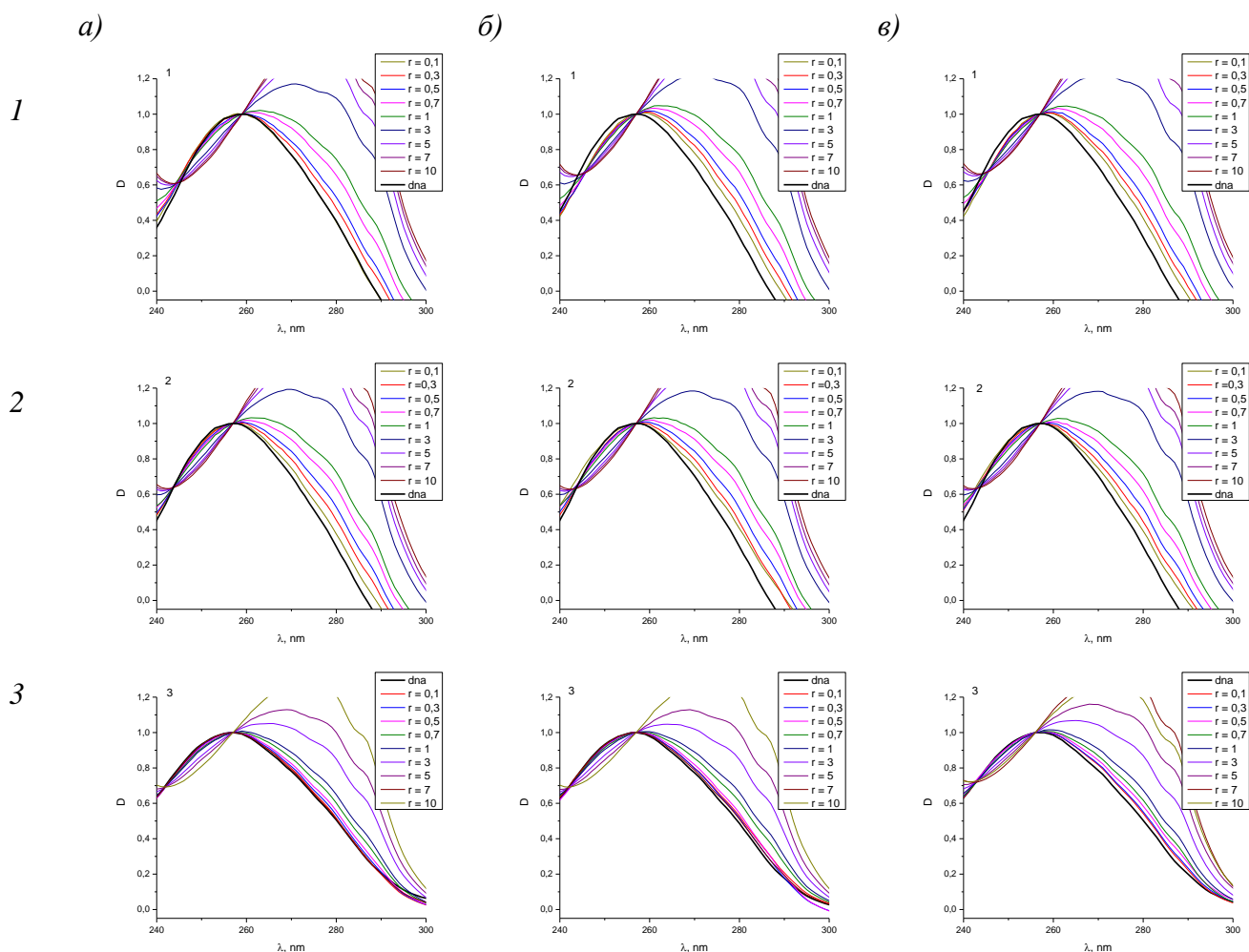


Рис. 3.4.3 Нормированные на максимум поглощения ДНК спектры комплексов с панкреатеном различной концентрации: полученные после приготовления растворов (а), через два часа (б) и через сутки (в). Системы пронумерованы (1-3).

Можно сделать вывод, что пептид взаимодействует с молекулой ДНК по нормированным на максимум поглощения ДНК спектрам комплексов.

Наблюдаемые изменения могут быть вызваны как изменением спектра поглощения пептида (в области более 240 нм – поглощения аминокислоты триптофана), так и изменением спектра полосы поглощения ДНК из-за связывания пептида с ее азотистыми основаниями, ответственными за спектральные свойства макромолекулы.

Часть 4. Вывод

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что взаимодействие макромолекулы ДНК со всеми пептидами *in vitro* реализуется. При этом сами механизмы взаимодействия пептидов отличаются, что видно по спектральным изменениям у ДНК. На рисунке 4.1 приведены усредненные данные по всем трем сериям измерений (после приготовления растворов, через два часа и на следующий день) эпیتالона, пинеалона и бронхогена.

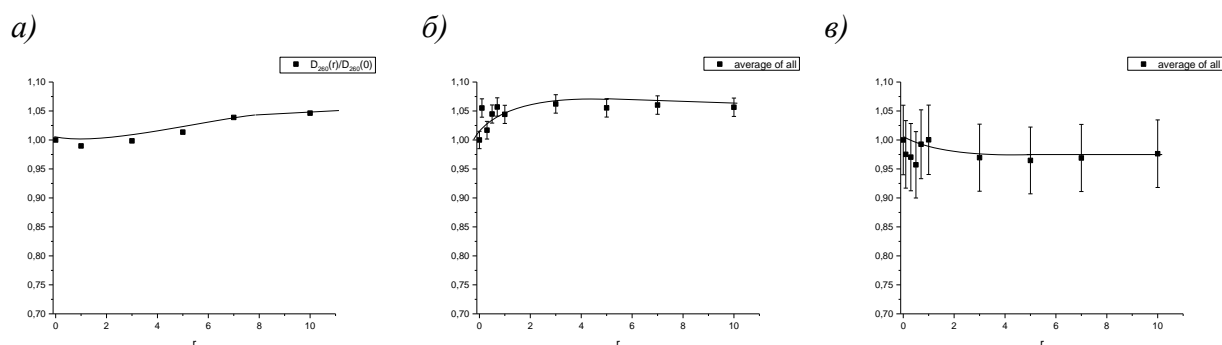


Рис. 4.1 Усредненные данные по всем измерениям пептидов: эпیتالон (а), пинеалон (б) и бронхоген (в).

Из рисунка 4.1 видно, что у эпیتالона и пинеалона в разной мере проявляется гиперхромный эффект, тогда как у бронхогена – гипохромный.

AEDG и AEDL связываются с азотистыми основаниями ДНК, причем возможным местом связывания тетрапептидов и ДНК является атом N7 гуанина в большой бороздке макромолекулы. Подобный характер спектральных изменений наблюдался при протонировании ДНК по N7 гуанина [26].

Установлено, что пептиды AEDG и AEDL оказывают влияние на вторичную структуру ДНК, вследствие связывания с азотистыми основаниями. Образование комплекса эпیتالона с ДНК приводит к заметной дестабилизации двойной спирали.

На основании спектральных данных видно, что тетрапептид KEDW связывается с молекулой ДНК в растворе. Заметен гипохромный эффект, что говорит о влиянии пептида на макромолекулу.

Заключение

В результате проведенного исследования установлен факт взаимодействия коротких пептидов AEDG, EDR, AEDL, KEDW с ДНК. Актуальной задачей остается прямое экспериментальное подтверждение связывания пептидов с ДНК, оценка влияния пептидов на третичную структуру макромолекулы и определение непосредственных участков взаимодействия пептидов с ДНК. Выбранная модель изучения ДНК-пептид в растворе хлорида натрия позволила зафиксировать сам факт связывания пептидов с ДНК.

Для изучения взаимодействия ДНК и пептидов использовались только спектральные методы. Для дальнейшего изучения влияния пептидов на конформацию молекулы ДНК можно провести такие эксперименты, как вискозиметрия и двойное лучепреломление. Также рассмотреть плавление ДНК в присутствии не только эпителина, но и других исследуемых пептидов.

В первой части работы приведены результаты научных исследований, которые раскрывают биологическую активность рассматриваемых пептидов. Далее рассмотрены методики проведения эксперимента и приведены обсуждения результатов. Тем не менее, остается нерешенной задача установления нуклеотидных последовательностей участков связывания пептидов с ДНК экспериментальным путем, которая может быть решена с помощью методов флуоресценции и ядерно-магнитного резонанса.

В заключение я хотел бы выразить благодарность своему научному руководителю проф. Касьяненко Н.А. и Морозовой Е.А. за помощь в проведении работы.

Список литературы

1. Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С., Проняева В.Е., Шатаева Л.К., Якуцени П.П. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012, том 154, №9, с. 391.
2. Хавинсон В.Х., Соловьев А.Ю., Тарновская С.И., Линькова Н.С. // Успехи современной биологии, 2013, том 133, №3, с. 310-316.
3. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Кветной И.М. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012, том 153, №2, с. 223-226.
4. Трофимова С.В., Хавинсон В.Х. // Успехи геронтологии, 2002, вып. 9, с. 79-82.
5. Хавинсон В.Х., Анисимов С.В., Малинин В.В. и др. // Пептидная регуляция геном и старение, М.: РАМН, 2005, с. 208.

6. *Хавинсон В.Х., Бондарев И.Э., Бутюгов А.А.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2003, том 135, №6, с. 692-695.
7. *Хавинсон В.Х., Чернова А.А., Шатаева Л.К.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2003, том 136, №9, с. 328-330.
8. *Khavinson V.Kh., Malinin V.V., Vanyushin B.F.* // Amino Acids, 2011, vol. 41, p. 251-255.
9. *Умнов Р.С., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х.* // Успехи геронтологии, 2013, том 26, №4, с. 671-678.
10. *Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Тарновская С.И.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016, том 162, №8, с. 259-264.
11. *Khavinson V.Kh., Ryzhak G.A., Grigoriev E.I. et al.* // Peptide substance restoring respiratory organs function, US Patent US 7, 625, 870 B2, 2009.
12. *Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Полякова В.О. и др.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012, том 153, №1, с. 148-151.
13. *Хавинсон В.Х., Рыжак Г.А., Линькова Н.С.* // Молекулярная медицина, 2014, №6, с. 14-20.
14. *Хавинсон В.Х., Малинин В.В.* // Проблемы эндокринной патологии №4, 2010, с. 61-70.
15. *Denisov G., Wanaski S., Luan P. et al.* // Biophys. J., 1998, vol. 74, №2, p. 731-744.
16. *Fedoreeva L.I., Vanyushin B.F.* // Biochemistry, 2011, vol. 76, №6, p. 651-657.
17. *Спирин А.С.* // Биохимия, 1958., том 23, № 5, с. 656-662.
18. *Демченко А.П.* // Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков, Киев: Наукова Думка, 1981, с. 208.
19. *Ельяшевич М.А.* // Атомная и молекулярная спектроскопия, М: Эдиториал УРСС, 2001, с. 896.
20. *Иоффе Б.В., Костиков Р.Р., Разин В.В.* // Физические методы определения строения органических молекул, Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1976.
21. *Свердлова О.В.* // Электронные спектры в органической химии, Л: Химия, 1973.
22. *Вилков Л.В., Пентин Ю.А.* // Физические методы исследования в химии. Структурные методы и оптическая спектроскопия. М.: Высшая школа, 1987.
23. *Зенгер В.* // Принципы структурной организации нуклеиновых кислот, пер. с англ., М.: Мир, 1987, с. 58.
24. *Евдокимов Ю.М.* // Журнал всесоюзного химического общества им. Менделеева, 1975, том 20, с. 259-270.
25. *Волькенштейн М.В.* // Биофизика, М.: Наука, 1998, с. 233-242.
26. *Kasyanenko N.A., Zanina A.V., Nazarova O.V. et al.* // Langmuir, 1999, vol. 15. p. 7912-7917.